

Virginia Ruiz Artiga

Estudios sobre la inactivación,
activación y germinación de
especies esporuladas de interés
en alimentos

Director/es

Condón Usón, Santiago
Mañas Pérez, María Pilar

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

ESTUDIOS SOBRE LA INACTIVACIÓN,
ACTIVACIÓN Y GERMINACIÓN DE ESPECIES
ESPORULADAS DE INTERÉS EN ALIMENTOS

Autor

Virginia Ruiz Artiga

Director/es

Condón Usón, Santiago
Mañas Pérez, María Pilar

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

2021



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

Estudios sobre la inactivación, activación y
germinación de especies esporuladas de interés en
alimentos

Autor

Virginia Ruiz Artiga

Director/es

Dra. Pilar Mañas Pérez
Dr. Santiago Condón Usón

Facultad de Veterinaria
2021



Escuela
de Doctorado
Universidad Zaragoza



Departamento de
Producción Animal
y Ciencia de los Alimentos
Universidad Zaragoza

D. Santiago Condón Usón, y Dña. M^a Pilar Mañas Pérez, Catedrático y Profesora Titular del Área de Tecnología de los Alimentos del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza,

Certifican:

Que la Tesis Doctoral titulada “Estudios sobre la inactivación, activación y germinación de especies esporuladas de interés en alimentos”, de la que es autora Virginia Ruiz Artiga, ha sido realizada bajo su dirección, su contenido se corresponde con el Plan de Investigación aprobado en su momento por la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos y cumple los requisitos requeridos para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

En Zaragoza, a 16 de septiembre de 2021

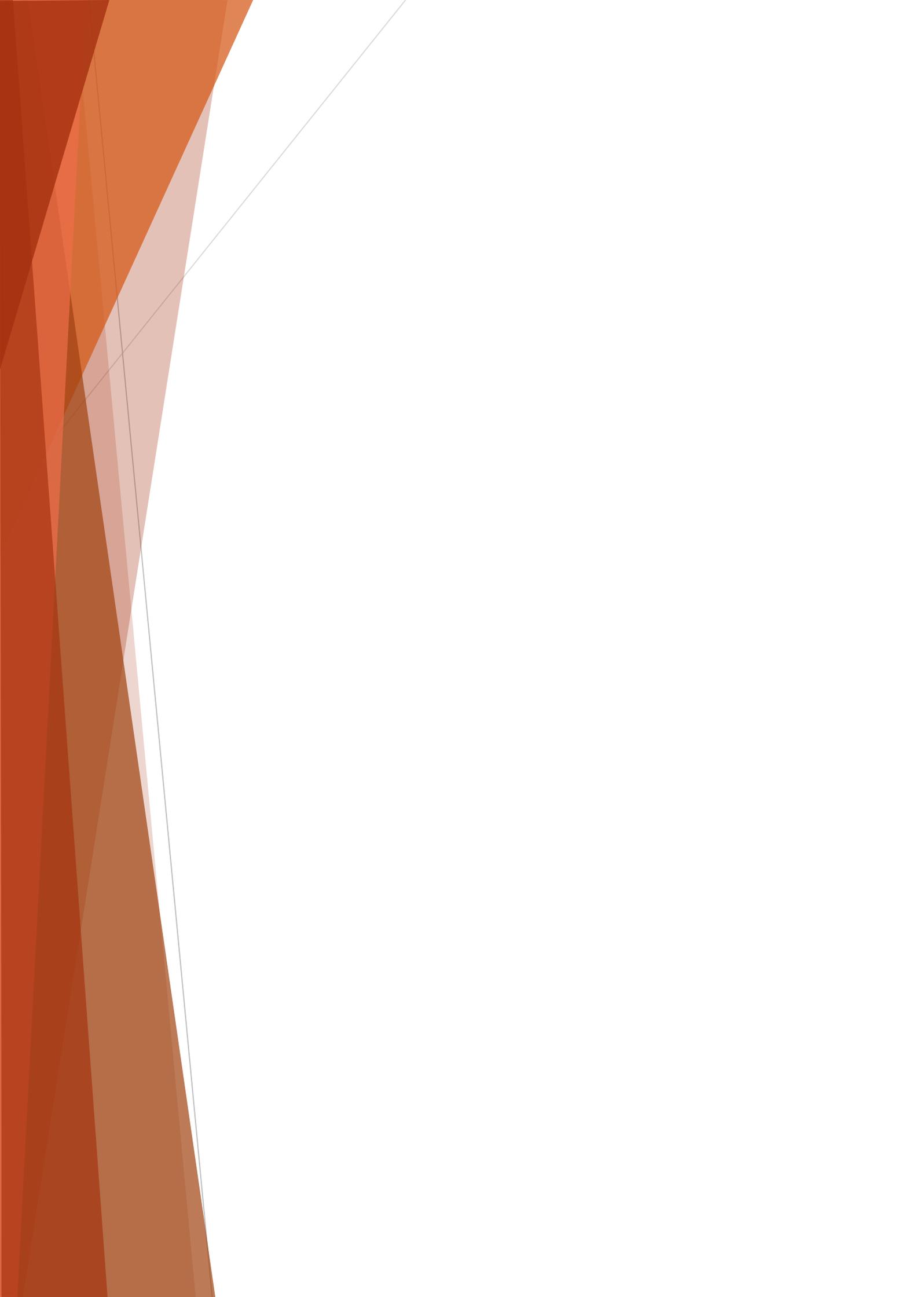
Fdo: Santiago Condón Usón

Fdo: M^a Pilar Mañas Pérez

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a una ayuda para la Formación de Personal Investigador (FPI, convocatoria 2016) concedida por el Ministerio de Economía y Competitividad (BES-2016-077256), así como al apoyo y financiación del grupo de investigación de referencia A03_20R-Nuevas tecnologías de procesado de los alimentos de la Universidad de Zaragoza, al Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2) y a la concesión de los siguientes proyectos:

- Proyecto AGL2015-69565-P “Búsqueda de estrategias de conservación de alimentos que aseguren la inactivación de los microorganismos más resistentes (esporos y/o mutantes anormalmente resistentes)”. MINECO (2016/2020).
- Proyecto PGC2018-093789-B-I00 “Generación de variantes microbianas resistentes (mutantes y esporos superlatentes) y desarrollo de estrategias que favorezcan su eliminación y/o prevención en alimentos”. Agencia Estatal de Investigación (2019/2021).
- Proyecto PID2019-104712RA-I00 “Análisis del impacto de la historia de esporulación en la dinámica de germinación y resucitación en esporos de *B. subtilis*. Agencia Estatal de Investigación (2020/2023).
- Proyecto SGI 229453 “Multilector de microplacas “CLARIOstar Plus” B-431.501” Universidad de Zaragoza (2020).

Índice

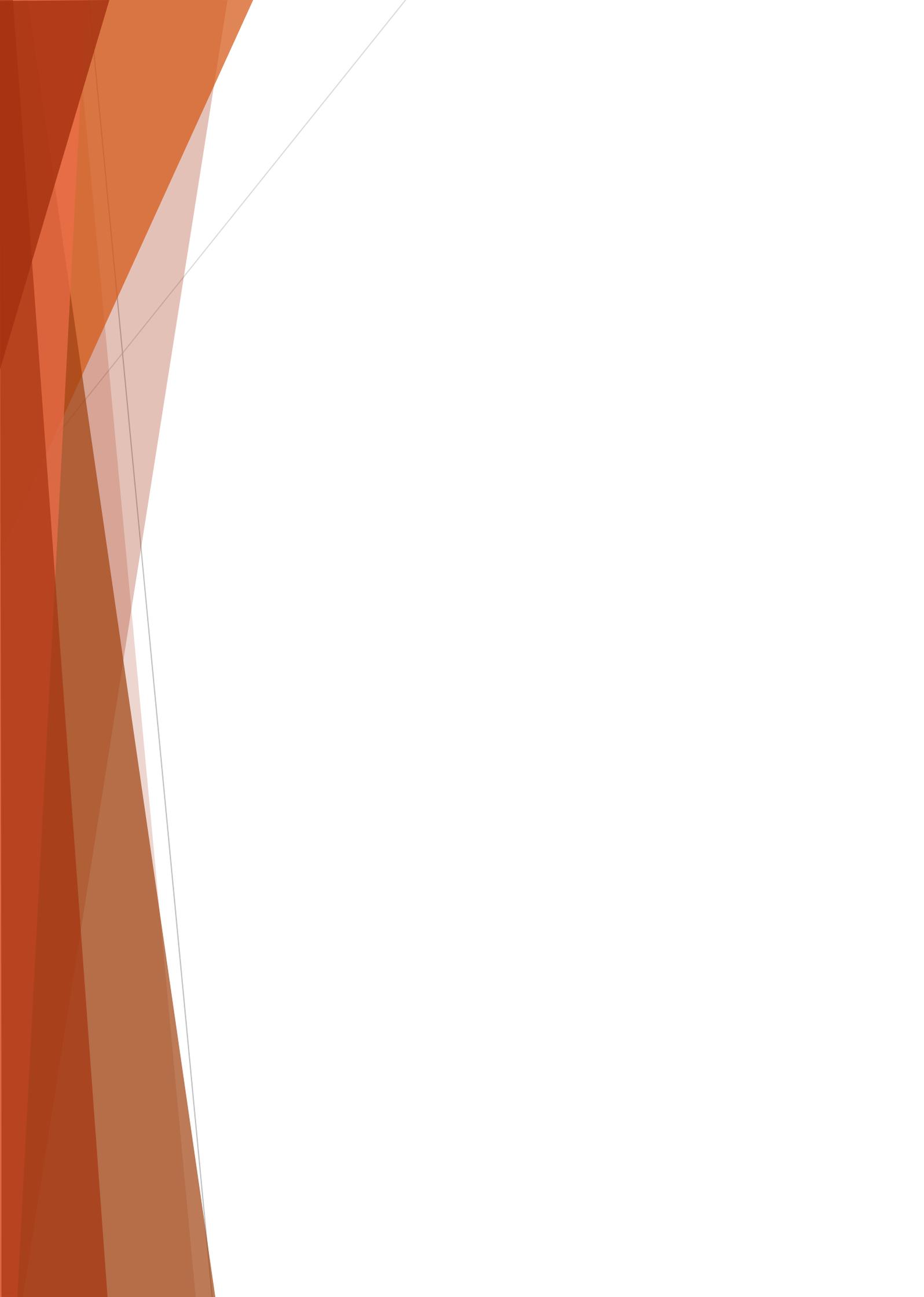


Resumen	1
1. Introducción.....	7
1.1.Importancia de las especies esporuladas en la industria alimentaria	11
1.1.1. Clasificación de las bacterias esporuladas	12
1.1.2. Patogeneidad asociada a las bacterias formadoras de esporos de interés ...	12
1.1.3. Deterioro de productos alimentarios asociado a bacterias formadoras de esporos	14
1.2.Estructura del esporo y bases biológicas que justifican su resistencia	16
1.2.1. Exosporio o “exosporium”	16
1.2.2. Cubierta o “coat”	17
1.2.3. Membrana externa o “outer membrane, OM”	19
1.2.4. Córtex.....	19
1.2.5. Pared celular o “germ cell wall”	21
1.2.6. Membrana interna o “inner membrane”.....	22
1.2.7. Protoplasto o “core”	23
1.3.Ciclo vital de las especies esporuladas.....	26
1.3.1. Fases de la esporulación.....	26
1.3.2. Factores de transcripción de la esporulación	29
1.3.3. Etapas de la germinación	32
1.3.3.1.Activación	33
1.3.3.2.Fase I germinación	35
1.3.3.3.Fase II germinación.....	37
1.3.3.4.Fase de desarrollo (outgrowth)	39
1.3.4. Factores de la germinación	40
1.3.4.1.Receptores de la germinación (GRs)	40
1.3.4.2.Proteína GerD	41
1.3.4.3.Proteínas SpoVA.....	42
1.3.4.4.Enzimas líticos del córtex (CLEs)	43
1.3.5. Otros mecanismos de germinación	45
1.3.5.1.Germinación inducida por Ca-DPA	46
1.3.5.2.Germinación inducida por altas presiones hidrostáticas	47
1.3.5.3.Germinación inducida por dodecilamina	47
1.3.5.4.Germinación inducida por lisozima	48

1.3.5.5. Germinación inducida por fracciones de peptidoglicano.....	48
1.4. Esporos superlatentes	50
1.5. Cuestiones sin resolver.....	53
1.5.1. Activación	53
1.5.2. Receptores de la germinación (GRs)	53
1.5.3. Compromiso y periodo de retraso (lag period)	54
1.5.4. Proteínas SpoVA.....	55
1.5.5. Membrana interna	55
1.5.6. Enzimas líticos del córtex	56
1.5.7. ¿Es necesaria la síntesis de proteínas para la germinación?	56
1.5.8. Germinación inducida con L-alanina.....	57
1.5.9. ¿Cómo se inactivan los esporos?	57
1.6. Inactivación de esporos por calor	59
1.6.1. Mecanismos de inactivación de esporos por calor húmedo y factores fisiológicos que influyen en la termorresistencia.....	59
1.6.2. Factores medioambientales que condicionan la termorresistencia	65
1.6.3. Cinética de inactivación de los esporos por calor	71
1.6.4. Modelización de las gráficas de supervivencia.....	75
2. Justificación y objetivos.....	77
3. Material y métodos.....	81
3.1. Microorganismos y medios de cultivo y recuperación	83
3.2. Tratamientos térmicos.....	85
3.3. Tratamientos con Altas Presiones Hidrostáticas (APH)	87
3.4. Tratamientos de Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEAV).....	88
3.5. Tratamientos con radiación ultravioleta (UV)	90
3.6. Tratamiento con germinantes.....	91
3.7. Evaluación de la germinación	92
3.7.1. Densidad óptica.....	92
3.7.2. Pasterización	93
3.8. Salida de DPA.....	94
3.9. Tinción con IP y Syto 16.....	98

3.10. Determinación de fluidez de membrana mediante polarización generalizada con lauridan y mediante anisotropía con DPH	100
3.11. Modelización cinética de inactivación por calor	102
3.12. Análisis estadístico de los datos	103
4. Resultados y discusión	105
4.1.Desarrollos metodológicos.....	107
4.1.1. Estudio de las condiciones de esporulación de <i>G. stearothermophilus</i>	109
4.1.2. Puesta a punto de las técnicas de tinción con fluorocromos	116
4.2.Cinética de inactivación y cálculo de tratamientos de esterilización.....	135
4.2.1. Manuscrito I: Impact of shoulders on the calculus of heat sterilization treatments with different bacterial spores	139
4.2.2. Manuscrito II: Thermal inactivation kinetics of <i>Geobacillus stearothermophilus</i> spores obtained at different sporulation temperatures heated at different pH.....	147
4.3. Activación de esporos de <i>G. stearothermophilus</i>	161
4.4. Estudios acerca de la germinación en <i>Bacillus subtilis</i>	197
4.5. Estudio de la pérdida de resistencia al calor, a los PEAV y a la radiación ultravioleta de esporos parcialmente germinados	235
4.6. Estudio de la influencia de la temperatura de esporulación de <i>B. subtilis</i> en la germinación.....	261
5. Conclusiones	275
6. Bibliografía	279

Resumen



La producción de alimentos seguros y estables que conserven todas sus propiedades nutricionales y sensoriales sigue siendo el principal reto de la industria alimentaria, reto limitado en gran medida por la presencia de esporos bacterianos en los alimentos. Estas células se caracterizan por su carácter ametabólico y su extrema resistencia frente a agentes tanto físicos como químicos. Los esporos son una forma de resistencia que poseen algunas bacterias para garantizar la supervivencia de la población. Cuando las condiciones ambientales son adecuadas, los esporos vuelven al estado metabólico a través de la germinación. Sin embargo, no todos ellos responden a los mismos estímulos y/o al mismo tiempo, de hecho, existen esporos, denominados superlatentes, que necesitan de un estímulo adicional para germinar.

En la actualidad tan solo los tratamientos muy intensos, especialmente los tratamientos térmicos, son capaces de inactivar eficientemente estas células. Hay aspectos que todavía no se conocen con profundidad como son la presencia de fenómenos de hombro en las gráficas de supervivencia donde, en algunos casos, el recuento puede llegar a aumentar durante los primeros instantes del tratamiento. Se cree que estos perfiles podrían deberse parcialmente a fenómenos de daño y reparación celular y también a la activación de esporos superlatentes. Sin embargo, se desconoce si la duración de estos hombros puede predecirse de alguna manera, permitiendo calcular de forma segura los tiempos de esterilización a nivel industrial. Tampoco se ha estudiado con detalle el fenómeno de activación por calor.

No obstante, los tratamientos térmicos producen alteraciones nutricionales y sensoriales en los alimentos, por lo que en las últimas décadas se ha dedicado mucho esfuerzo en desarrollar nuevas tecnologías de conservación de alimentos que preserven sus propiedades, aunque hasta la fecha, ninguna de ellas ha demostrado ser suficientemente eficaz en la inactivación de esporos. Es por ello que una estrategia de conservación propuesta consiste en inducir la germinación de los esporos para, posteriormente, inactivarlos con un tratamiento menos severo. Sin embargo, esta estrategia ha probado ser muy compleja debido a la falta de conocimiento acerca del proceso de germinación de los esporos.

En resumen, quedan todavía muchas cuestiones sin resolver acerca de la activación, germinación e inactivación de los esporos bacterianos. Por tanto, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido aportar conocimientos acerca de distintos

aspectos de los esporos bacterianos con el fin de poder facilitar el diseño de nuevos tratamientos de conservación de alimentos.

En primer lugar, se estudió el fenómeno de hombro de las curvas de supervivencia por calor en distintas bacterias esporuladas y se observó que la duración de estos hombros estaba relacionada con el valor D y que la relación S/D era característica de cada microorganismo e independiente de la temperatura de tratamiento. Este nuevo parámetro facilita el cálculo fiable de tiempos de tratamiento térmico. De todas las especies estudiadas, *G. stearothermophilus* fue la que mostró un mayor valor del parámetro S/D . Para este microorganismo se demostró que el parámetro S/D se veía afectado por la temperatura de esporulación, siendo mayor a la temperatura óptima. El efecto del pH del medio de tratamiento era menor.

Se constató que *G. stearothermophilus* mostraba un aumento del recuento al inicio del tratamiento, lo que se ha relacionado con la activación de esporos superlatentes, que supone un gran problema a nivel industrial por la dificultad de detectarlos con los métodos microbiológicos convencionales. Dada la importancia del fenómeno de activación, se puso a punto un protocolo de esporulación con el que se obtenía una suspensión de *G. stearothermophilus* con un 90% de esporos superlatentes y se estudió el efecto de distintos tratamientos en la activación y posterior germinación de los esporos obtenidos. Además, para estudiar las cinéticas de activación térmica, se desarrolló una nueva ecuación matemática que permitía describir la fase de activación. Esta nueva ecuación describía con precisión los hombros debidos a la activación de esporos superlatentes.

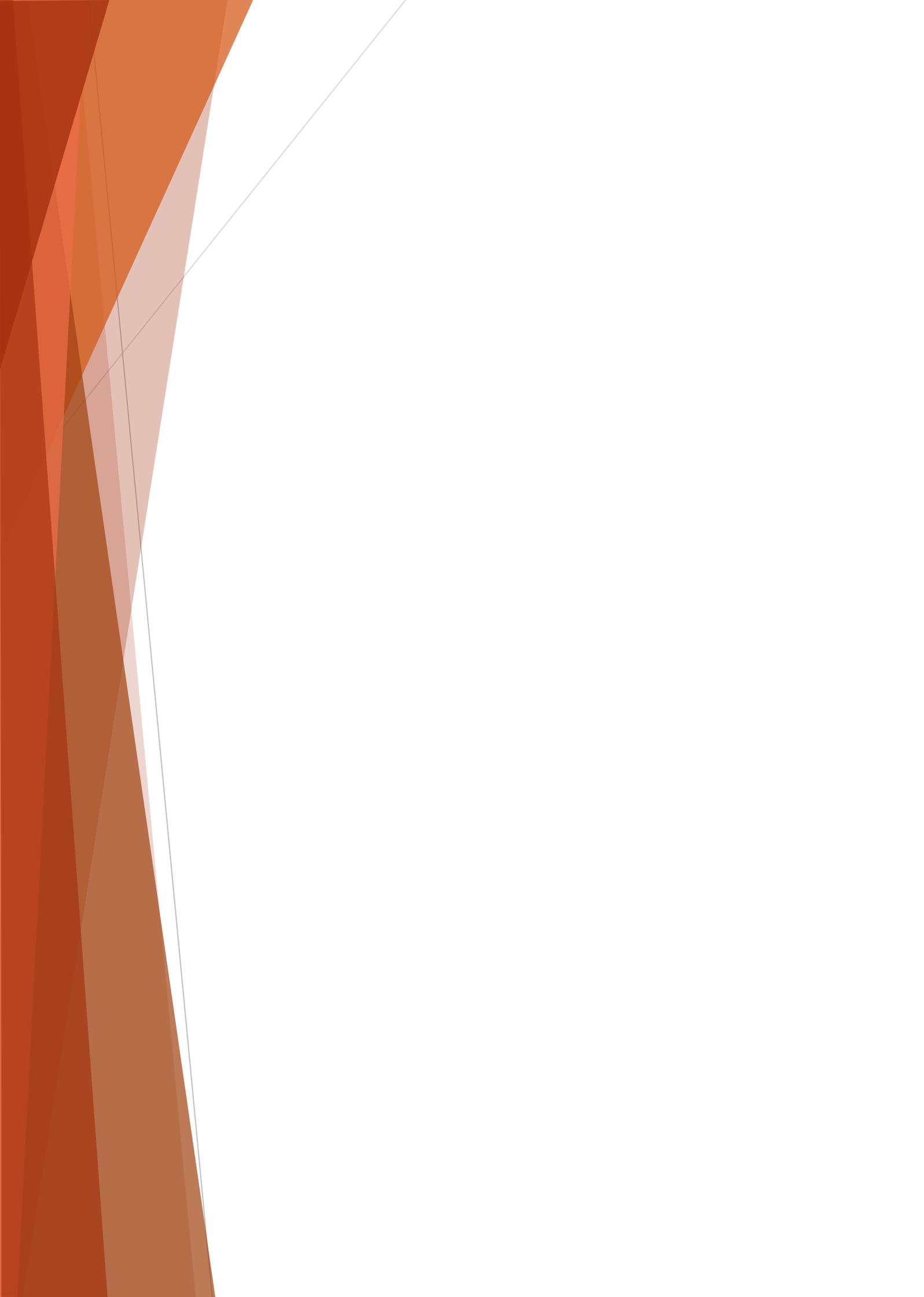
Por otro lado, es importante considerar que los esporos una vez germinados son mucho más sensibles a los tratamientos de conservación de alimentos. Es por ello, que en esta Tesis Doctoral se ha dedicado un gran esfuerzo a estudiar los aspectos fisiológicos implicados en la germinación, para lo que fue necesario poner a punto metodologías para evaluar daños en algunas estructuras celulares. Los resultados obtenidos muestran que durante el proceso de germinación se producen algunos cambios en los esporos, como la permeabilización de la membrana interna, fenómeno que no había sido descrito previamente. Además, dichos cambios eran dependientes del agente germinante.

Posteriormente, se evaluó la resistencia de los esporos en distintas fases de la germinación a tres tecnologías: calor, PEAV y radiación UV y se observó que los esporos parcialmente germinados eran más resistentes frente a las tres tecnologías que las células

vegetativas y que la pérdida de resistencia tenía lugar en momentos diferentes de la germinación, en función de la tecnología empleada y del agente germinante al que habían estado expuestos.

Por último, se estudió también el efecto de la temperatura de esporulación en la germinación y se observó que una mayor temperatura de esporulación daba como resultado esporos con mayor capacidad de germinación, frente a diferentes agentes germinantes. Además, se observó que estos esporos obtenidos a mayor temperatura tenían una membrana interna más permeable, aunque no fue posible detectar cambios en su fluidez.

1. Introducción



La esporulación es una estrategia de supervivencia a los estreses ambientales que poseen algunas bacterias. Estas bacterias, cuando detectan que las condiciones ambientales no son las adecuadas, como una baja concentración de nutrientes, pasan a un estado ametabólico en el que el genoma se encuentra protegido. Es decir, la esporulación se podría definir como el proceso por el que una célula vegetativa, con actividad metabólica normal, se convierte en una estructura refringente, ametabólica y de elevada resistencia química y mecánica. La germinación, por el contrario, es la vuelta al estado metabólico de los esporos, es decir, la vuelta a célula vegetativa con baja resistencia química y física.

Los esporos bacterianos se encuentran entre los organismos más resistentes que existen, es por ello que han sido objeto de estudio desde su descubrimiento a finales del siglo XIX por Cohn y Koch (Gould, 2006). Cohn descubrió que los esporos eran más termorresistentes que las células vegetativas; se necesitaban temperaturas mayores de 100°C para destruirlos. También observó que los esporos no eran capaces de germinar en el mismo medio de cultivo donde habían esporulado, pero sí que lo hacían en infusión de heno fresca (Gould, 2006). No fue hasta 1888, cuando fue descrito por primera vez el ciclo vital de los esporos en medios de cultivo de laboratorio: esporulación, germinación, multiplicación y reesporulación (Koch, 1888).

Más tarde, gracias a los estudios de Appert (1811), quien demostró que cuando se aplicaba un tratamiento térmico en un recipiente cerrado se prolongaba la vida útil de los alimentos a temperatura ambiente, se sentaron las bases de la termobacteriología. Bigelow (1921) realizó la primera evaluación en términos matemáticos de la esterilización por calor y más tarde Esty y Meyer (1922) estudiaron la termodestrucción de *Clostridium botulinum*. Estos estudios permitieron determinar los tiempos necesarios para el tratamiento térmico en las industrias conserveras.

Desde entonces se ha invertido mucho esfuerzo en conocer los mecanismos por los que los esporos se inactivan, pero, sobre todo, los mecanismos mediante los cuales germinan, ya que los esporos pierden su extraordinaria resistencia a los tratamientos de conservación de alimentos una vez que germinan. Por tanto, una estrategia para la conservación de alimentos sería en primer lugar germinar los esporos, para después inactivarlos con tratamientos más suaves que no dañasen el producto.

Sin embargo, este planteamiento puede ser muy complicado debido a la variabilidad y heterogeneidad del proceso de germinación entre los esporos, incluso dentro de una misma suspensión y, por tanto, hasta la fecha no ha sido posible su aprovechamiento.

1.1 Importancia de las especies esporuladas en la industria alimentaria

Los microorganismos esporulados son los responsables del deterioro de muchos alimentos, así como de enfermedades transmitidas por los mismos. Dada su extraordinaria resistencia tanto a agentes físicos como químicos y a su estado ametabólico, que les permite sobrevivir en ese estado durante muchos años, su inactivación es esencial, sobre todo en los productos tratados por calor que son estables a temperatura ambiente durante largos periodos de tiempo. Si en estos productos sobreviviera algún espora, podría germinar y multiplicarse, pudiendo causar problemas tanto a nivel económico como a nivel sanitario. En E.E.U.U. alrededor del 1,4 % de las toxiinfecciones alimentarias reportadas fueron causadas por *Bacillus cereus* y en torno al 4 % por *Clostridium perfringens* entre los años 1998 y 2008 (Bennett y col., 2013).

Además, estos microorganismos son de naturaleza ubicua, por lo que pueden encontrarse en gran cantidad de ambientes. Resulta importante también tener en cuenta que estas bacterias pueden estar presentes y multiplicarse en distintas zonas de la planta de procesado, ya que la forma ametabólica es muy resistente a los métodos de limpieza y desinfección empleados en la industria.

La Figura 1.1 muestra las principales fuentes de contaminación de alimentos por bacterias esporuladas.

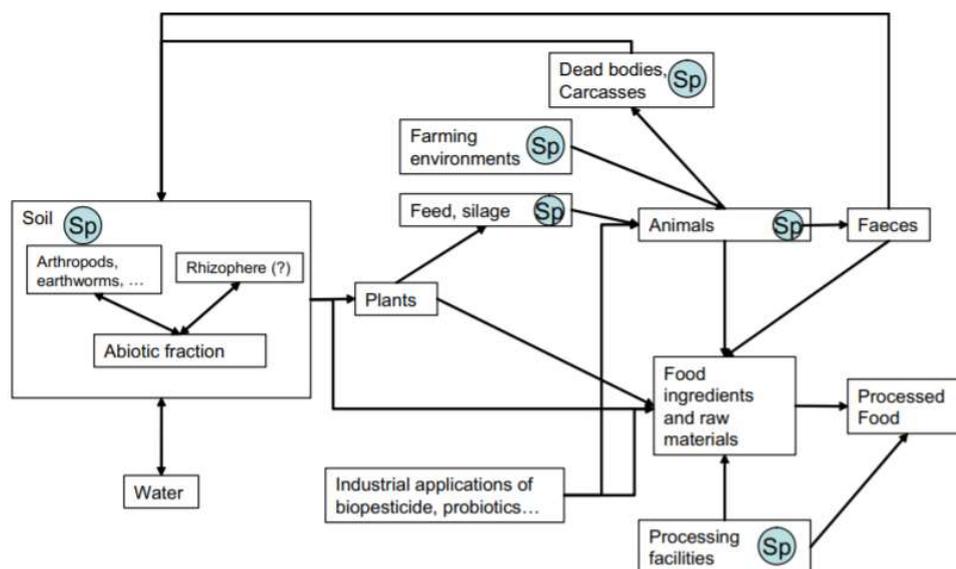


Figura 1.1. Diagrama de flujo de las principales rutas de contaminación de los alimentos con bacterias esporuladas. Sp indica posibles ambientes en los que puede tener lugar la esporulación (extraído de Carlin (2011)).

1.1.1. Clasificación de las bacterias esporuladas

Los esporos bacterianos tradicionalmente se han clasificado en dos órdenes, *Bacillales*, que englobaban los microorganismos aerobios y *Clostridiales* donde se encontraban los anaerobios estrictos. Sin embargo gracias a los avances en las herramientas moleculares, se han establecido dos nuevos órdenes: *Thermoanaerobacterales*, que está compuesto principalmente por bacterias termófilas anaerobias que antes se encontraban dentro del orden *Clostridiales*, y *Halanaerobiales* (Vos y col., 2011). La Tabla 1.1 muestra la clasificación actual.

Dentro del orden *Bacillales* se encuentran nueve familias, entre las que hay varios géneros de bacterias esporuladas como *Bacillus*, *Geobacillus* y *Alicyclobacillus*, entre otros. Por otro lado, dentro de los *Clostridiales*, el género más conocido es *Clostridium* (Vos y col., 2011).

Tabla 1.1 Clasificación de las bacterias esporuladas.

Dominio	Filo	Clase	Orden	Familia
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>
				<i>Alicyclobacillaceae</i>
				<i>Paenibacillaceae</i>
				<i>Planococcaceae</i>
				<i>Sporolactobacillaceae</i>
				<i>Thermoactinomycetaceae</i>
		Clostridia	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>
				<i>Heliobacteriaceae</i>
				<i>Lachnospiraceae</i>
				<i>Peptococcaceae</i>
				<i>Ruminococcaceae</i>
				<i>Syntrophomonadaceae</i>
				<i>Veillonellaceae</i>
				<i>Halanaerobiaceae</i>
<i>Halanaerobiales</i>	<i>Halobacteroidaceae</i>			
		<i>Thermoanaerobacterales</i>	<i>Thermoanaerobacteraceae</i>	

1.1.2. Patogenicidad asociada a las bacterias formadoras de esporos de interés en alimentos

Dentro del género *Bacillus*, *B. cereus* es la especie más identificada en toxiinfecciones alimentarias (EFSA, 2005a). Este microorganismo puede causar dos tipos

de intoxicaciones alimentarias: por un lado, cuando las células crecen en el alimento, se puede formar una toxina termoestable (cereulida) que causa vómitos (forma emética). Por otro lado, la forma diarreica se produce por la ingestión de las bacterias y la posterior formación de enterotoxinas en el intestino, causando diarrea y dolor abdominal (Logan, 2012).

La incidencia de *B. cereus* en toxiinfecciones alimentarias parece ser mayor en países del norte de Europa (20 – 33 %) y en Canadá (14 %), aunque los motivos que justifican estas diferencias no se conocen (Peck, 2010).

Cabe destacar que mientras la forma emética se ha relacionado con productos cárnicos, vegetales, cremas, especias, productos lácteos y huevos, la forma diarreica se asocia más con productos ricos en almidón, como el arroz (Griffiths y Schraft, 2017; Peck, 2010).

En cuanto a las bacterias formadoras de esporos anaerobias, *Clostridium perfringens* y *C. botulinum* son las más involucradas en toxiinfecciones alimentarias (EFSA, 2005b). Mientras que *C. perfringens* causa síntomas leves, *C. botulinum* produce una neurotoxina que puede causar problemas más serios pudiendo llegar a causar la muerte.

El hábitat natural de *C. botulinum* son los suelos y sedimentos, por lo que la incidencia de este patógeno en vegetales y pescados es mayor (Peck, 2010). Sin embargo, otros alimentos pueden ser también causa de toxiinfecciones por este microorganismo, debido a contaminaciones cruzadas o por ingredientes contaminados.

Las neurotoxinas producidas por *C. botulinum* pueden dividirse en siete tipos (A-G), en función de sus propiedades serológicas (Lindström y col., 2010). La prevalencia de los diferentes tipos es dependiente de la localización, por ejemplo, *C. botulinum* proteolítico tipo A es más común en los suelos del oeste de Estados Unidos, China, Brasil y Argentina, la prevalencia de *C. botulinum* proteolítico tipo B es mayor en el este de Estados Unidos y *C. botulinum* no proteolítico tipo B predomina en Europa (Peck, 2010). *C. botulinum* no proteolítico tipo E se ha asociado principalmente con sedimentos marinos y de agua dulce en regiones templadas (Peck, 2010).

1.1.3. Deterioro de productos alimentarios asociado a bacterias formadoras de esporos

Estos microorganismos también se han relacionado con el deterioro de los alimentos. Algunos géneros son más comunes en determinados alimentos, como es el caso de *Bacillus* en productos de panadería, donde el origen de la contaminación podría venir de la materia prima empleada.

Por otro lado, el género *Clostridium* está más involucrado con el deterioro de productos cárnicos envasados en ausencia de oxígeno (André y col., 2017).

En cuanto a los productos lácteos pasteurizados, parece que *B. cereus* es el principal responsable de su deterioro (Quigley y col., 2013), mientras que en la leche UHT los microorganismos más problemáticos son *G. stearothermophilus* y *B. coagulans*, ya que son esporos muy resistentes al calor (André y col., 2017).

En los quesos el género *Clostridium* provoca la hinchazón tardía, que conlleva grandes pérdidas económicas debido a la dificultad de detectar estos esporos en la leche cruda (Cremonesi y col., 2012). En cuanto a las conservas ácidas ($\text{pH} < 4,5$), como es el caso de los zumos, el espora más problemático es *Alycyclobacillus acidoterrestris* (Walker y Phillips, 2008), mientras que en conservas moderadamente ácidas (pH entre 3,8 y 4,5) como por ejemplo de tomate, el microorganismo que generalmente las deteriora es *Bacillus coagulans* (Mallidis y col., 1990; Palop, Raso, y col., 1999). Por otro lado, en las conservas no ácidas ($\text{pH} > 4,5$), las especies esporuladas termófilas son las principales responsables de su deterioro; André y col. (2013) encontraron que *Geobacillus stearothermophilus* era una de las especies termófilas más frecuentemente aislada (34%).

Como se puede apreciar, los microorganismos esporulados suponen un gran problema en la industria alimentaria. La presencia y crecimiento de estos microorganismos en los alimentos puede deberse a factores como su naturaleza ubicua, que hace imposible evitar su presencia en la materia prima; el hecho de que los procesos industriales, tales como la pasteurización, tan solo inactivan las células vegetativas, pero no los esporos; además, sus características adhesivas también favorecen su presencia en los equipos de procesamiento industrial, por lo que resulta posible cualquier contaminación cruzada de los alimentos (Postollec y col., 2012).

Para minimizar el problema, la industria alimentaria puede llevar a cabo unas buenas prácticas de higiene, que eviten contaminaciones cruzadas, así como aplicar

tratamientos térmicos de esterilización comercial a los alimentos, lo que reduce notablemente el riesgo de presencia de estos microorganismos o sus toxinas. Aunque hay que tener precaución ya que la mayor parte de los casos de intoxicación alimentaria están relacionados con alimentos tratados por calor, a los que durante el almacenamiento se les somete a temperaturas abusivas, que desencadenan la germinación y multiplicación, lo que lleva al consumo de elevados niveles de células vegetativas patógenas o toxinas (Postollec y col., 2012).

Sin embargo, la mayor preocupación actual reside en los alimentos mínimamente procesados puesto que los esporos podrían germinar y crecer durante el almacenamiento, incluso a temperaturas de refrigeración. Algunas especies esporuladas pueden germinar y crecer a temperaturas de refrigeración, como *Bacillus cereus*, *B. weihenstephanensis* o algunos géneros de *Clostridium*.

1.2. Estructura del esporo y bases biológicas que justifican su resistencia

Los esporos bacterianos se caracterizan principalmente por su estado ametabólico y por su extrema resistencia a condiciones severas. Ambos fenómenos se deben principalmente a su estructura y composición, que difiere notablemente de las de las células vegetativas. Los esporos están formados por varias capas de distinta naturaleza, lo que confiere protección frente a diversos agentes.

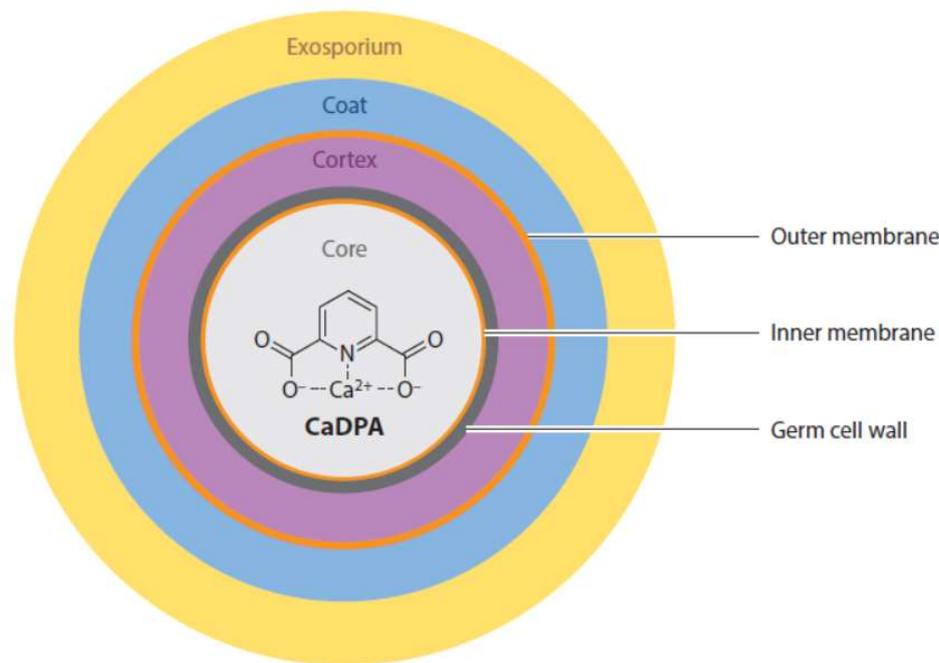


Figura 1.2. Esquema de la estructura del esporo bacteriano (extraído de Setlow y col. (2017)).

1.2.1. Exosporio o “exosporium”

El exosporio es la capa más externa que poseen algunos esporos, en particular los esporos del grupo de *B. cereus* y *B. anthracis*. Esta envoltura está compuesta por una estructura proteica que incluye algunas glicoproteínas únicas. Se cree que podría ser una extensión de la capa más externa de la cubierta o “coat”, dado que en algunas especies se han encontrado proteínas de la cubierta en el exosporio (Redmond y col., 2004; Setlow, 2006).

Se ha observado que los esporos de *B. subtilis* o bien no contienen exosporio, o es de tamaño muy reducido (Setlow, 2016), aunque sí que presentan unos filamentos en su

capa externa que podrían ser glicoproteínas; estas comprenderían la corteza externa o “crust” y estaría separada de la cubierta por un pequeño espacio (Stewart, 2015). No se sabe con certeza si esta corteza externa estaría presente también en la capa externa de la cubierta de los esporos que contienen exosporio, o en caso negativo, si la función de esta corteza externa sería la misma que la del exosporio en los esporos que lo contienen.

Steichen y col. (2007) observaron que el exosporio no es una capa uniforme, sino que hay dos regiones con diferente composición. Por un lado, está lo que se ha denominado tapón de botella “bottle cap”, que se sintetiza primero en la célula madre del esporo. Cuando esta parte alcanza la zona de unión entre las dos capas, la otra parte (no tapón de botella) se ensambla a la anterior. La intersección entre las dos zonas podría ser importante en el proceso de germinación. Steichen y col. (2007) demostraron que durante la germinación la parte tapón de botella se desplaza para permitir la salida de la célula, sugiriendo que la función de esta capa estaría relacionada con la salida de la célula vegetativa.

Otra teoría que se ha expuesto es que, dado que se encuentra en microorganismos patógenos, el exosporio podría también guardar relación con la interacción entre el esporo y el organismo diana. En el caso de *B. cereus*, se ha atribuido al exosporio su elevada capacidad de adhesión al acero inoxidable y a la formación de biofilms (Kumari y Sarkar, 2016). Por otro lado, Lequette y col. (2011) observaron que esporos de *B. cereus* carentes de una proteína del exosporio (proteína BclA), mostraban una mayor hidrofobicidad y una menor adhesión al acero inoxidable. Sin embargo, la función exacta de esta envoltura no se conoce.

En cualquier caso, parece que el exosporio no guarda relación con la resistencia de los esporos a la mayoría de los agentes, aunque sí que actúa como barrera frente a algunas proteínas grandes como los anticuerpos.

1.2.2. Cubierta o “Coat”

La cubierta está compuesta por diversas capas de naturaleza proteica, con pequeñas cantidades de carbohidratos y lípidos, siendo la tirosina y la cisteína los aminoácidos más comunes (Klobutcher y col., 2006). Son muchas las proteínas que componen esta cubierta, de hecho, se han identificado más de 50, principalmente

exclusivas de los esporos, aunque se desconoce la función individual de muchas de ellas (Setlow, 2006).

Parece que la función de esta estructura proteica es actuar como barrera y restringir el paso de gran cantidad de moléculas y sustancias químicas tóxicas, impidiéndoles acceder al interior del espora (Setlow, 2006). También se ha descrito un efecto protector frente a la depredación por protozoos (Klobutcher y col., 2006).

La cubierta protege al espora de sustancias como el hipoclorito, el dióxido de cloro y la radiación UV (Riesenman y Nicholson, 2000; Young y Setlow, 2003), así como a enzimas líticas de córtex como la lisozima. También se ha visto que la delección del gen *cotE*, que produce esporos con una cubierta muy defectuosa, sensibiliza los esporos frente a tratamientos de termosonicación (Fan y col., 2019). Sin embargo, parece que no ejerce ningún papel en la resistencia frente a ácidos orgánicos ni frente a los tratamientos térmicos (Ghosh y col., 2008; Moir, 1981).

La protección frente a la radiación UV de la cubierta podría deberse al enzima CotA. Esta proteína es una lacasa dependiente de cobre, localizada en la parte exterior de la cubierta, que produce un pigmento de estructura similar a la melanina (McKenney y col., 2013). La melanina actúa desactivando especies reactivas del oxígeno, por lo tanto, esto podría contribuir a la resistencia de los esporos a la luz UV así como al peróxido de hidrógeno. También se han encontrado superóxido dismutasas y catalasas en la cubierta (Setlow, 2011), que actúan eliminando las especies reactivas del oxígeno. Otro enzima importante presente en la parte externa de la cubierta es la alanina-racemasa (McKenney y col., 2013). Este enzima se encarga de convertir la L-alanina en D-alanina, inhibiendo la germinación por L-alanina.

Cabe destacar que, a pesar de tratarse de una barrera de permeabilidad frente a muchos compuestos, también debe permitir el paso de los nutrientes para que se desencadene la germinación. En este sentido se ha descrito que la cubierta permite el paso de moléculas de entre 2 y 8 KDa (Lai y col., 2003; Setlow, 2014).

Se está dedicando mucho esfuerzo a estudiar esta estructura, tanto las proteínas que la componen como el ensamblaje de las mismas, puesto que todo ello contribuirá a un mayor conocimiento de las bases moleculares responsables de sus propiedades bioquímicas, mecánicas y estructurales.

1.2.3. Membrana externa o “outer membrane, OM”

La membrana externa proviene de la célula madre y es fundamental para la formación del esporo, aunque se desconoce su misión, si la tiene, en el esporo ya formado (Setlow, 2011). Se ha visto que no influye en la resistencia frente a la radiación, el calor y algunas sustancias químicas (Setlow, 2006).

Esta membrana presenta una polaridad opuesta a la de la membrana interna, puesto que proviene de la membrana interna de la célula madre, que durante la esporulación se queda rodeando al esporo (Tocheva y col., 2011).

No sabemos si esta estructura permanece íntegra o no en el esporo latente (Setlow, 2006), ya que no hay evidencia del aislamiento de esta membrana. Además, no es fácil identificarla mediante microscopía electrónica; se ha descrito que muchos esporos poseen una membrana externa poco definida o indistinguible (Leggett y col., 2012). Sin embargo, sí que se ha hallado evidencia de su presencia en los esporos, se ha observado que *B. subtilis* posee en su cubierta o “coat” 11 proteínas relacionadas antigénicamente con proteínas presentes en la membrana de la célula vegetativa (Henriques y Moran, 2000). Además, Crafts-Lighty y Ellar (1980) encontraron enzimas de la cadena de transporte de electrones en extractos de las envolturas externas del esporo, lo que sugiere la presencia de una envoltura membranosa. Por otro lado, Gerhardt y col. (1982) observaron que la glucosa tan solo podía entrar al esporo hasta antes del córtex, sugiriendo la presencia de una envoltura funcional externa en este punto. La membrana externa podría ser la barrera de permeabilidad observada en las capas externas de los esporos latentes, pero también podría tratarse de una estructura vestigial sin ninguna función en el esporo maduro (Setlow, 2014).

En cualquier caso, si los esporos maduros presentan esta estructura íntegra y funcional, esta debe ser permeable a pequeñas moléculas, ya que debe permitir el paso de los nutrientes para que accedan a la membrana interna.

1.2.4. Córtex

El córtex está compuesto por peptidoglicano similar al presente en la pared celular de las células vegetativas, pero con algunas particularidades. A diferencia del peptidoglicano de la pared celular, el córtex presenta los restos de N-glucosamina y N-

murámico altamente acetilados y contiene ácido δ -lactámico murámico. La presencia de este compuesto permite a unos enzimas específicos (enzimas líticos del córtex) hidrolizar el peptidoglicano del córtex, sin afectar al peptidoglicano de la pared celular de la célula vegetativa naciente, durante la germinación del espora (Setlow, 2014). El córtex también presenta un nivel bajo de entrecruzamiento por puentes de péptidos entre las cadenas de glicano (Popham, 2002). Este entrecruzamiento no parece guardar relación con la deshidratación del protoplasto, pero sí influye en la tasa de germinación y crecimiento (Popham, 2002).

Otra diferencia entre el peptidoglicano de la célula vegetativa y del córtex es que, en el córtex, el 25,7% del ácido murámico es sustituido por tetrapéptidos y el 23,3% por L-alanina, mientras que en la célula vegetativa los residuos de ácido murámico son sustituidos principalmente por tripéptidos (Atrih y Foster, 1999).

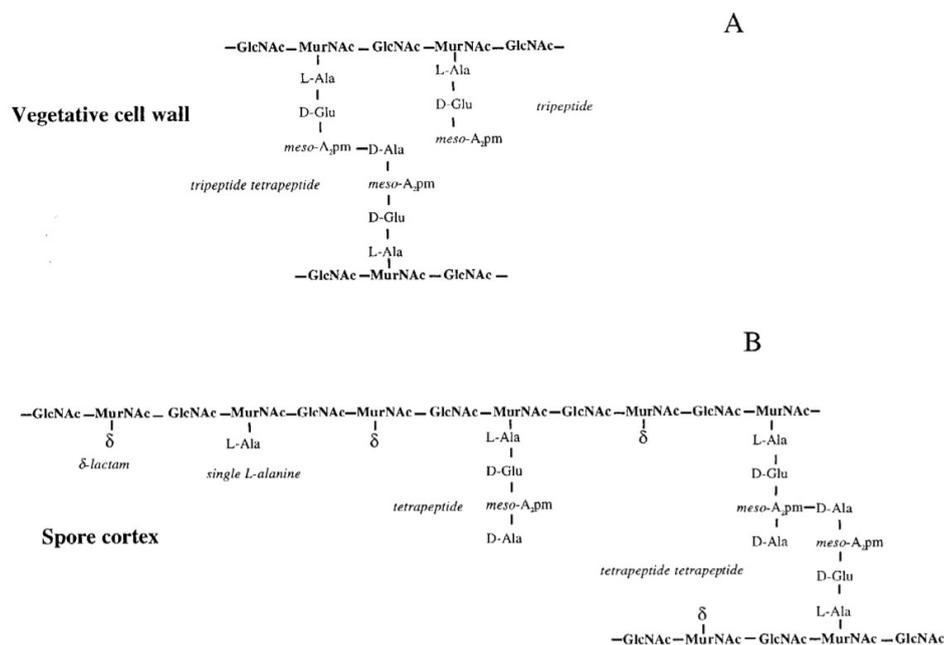


Figura 1.3. Estructura del peptidoglicano de la célula vegetativa (A) y del córtex del espora (B) (extraído de Atrih y Foster (1999)).

El córtex se ha descrito como una estructura esencial en la formación del espora, en la reducción del contenido en agua del protoplasto y en la resistencia al calor (Setlow, 2006, 2011). A pesar de que no se conoce el mecanismo por el cual se produce dicha reducción del contenido en agua, se ha relacionado con la presencia de ácido δ -lactámico murámico (Imae y Strominger, 1976). Sin embargo, un estudio en el que se empleó una

cepa mutante en el gen *cwlD*, carente de ácido δ -lactámico murámico, mostraba el mismo nivel de deshidratación y resistencia que los esporos nativos (Popham y col., 1996). También se ha relacionado con la capacidad del córtex de modificar su volumen, expandiéndose y contrayéndose (mediante entrecruzamiento de sus cadenas) en función de la concentración iónica del entorno (Popham y Setlow, 1993). La teoría de la expansión del córtex también se ha relacionado con la resistencia al calor (Gould y Dring, 1975), sin embargo estudios recientes contradicen esta hipótesis (Rao y col., 2016).

Parece que el córtex juega un papel importante en la viabilidad del espora, ya que, si el córtex se hidrolizase de forma incontrolada, la membrana interna se dañaría por la elevada presión osmótica que hay en el protoplasto (Setlow, 2011).

Como se ha mencionado, la hidrólisis del córtex es una etapa fundamental en la germinación del espora, de la que son responsables los enzimas líticos del córtex (CLE's); en *B. subtilis* se han descrito principalmente dos, CwlJ y SleB (Setlow, 2003). Los esporos tan solo necesitan uno de ellos para germinar y en ausencia de ambos no son capaces de pasar de la fase I de germinación. El enzima SleB es una transglicosilasa que se localiza entre el córtex y la cubierta, mientras que el enzima CwlJ se cree que se encuentra en la cubierta (Bagyan y Setlow, 2002). Estos enzimas responden a diferentes estímulos, el SleB se activa en respuesta a la presencia de nutrientes, mientras que el CwlJ necesita de dipicolinato cálcico (Ca-DPA).

1.2.5. Pared celular o “germ cell wall”

Se trata de la envoltura presente en la parte interna del córtex. Presenta una estructura similar a éste, puesto que está compuesta por peptidoglicano, aunque se diferencian en el grosor, así como en la ausencia de ácido δ -lactámico murámico. El peptidoglicano de la pared celular probablemente es idéntica al de las células vegetativas de las especies Gram-positivas y es previsible que no ejerza ningún papel en la resistencia del espora (Setlow, 2006).

La ausencia de ácido δ -lactámico murámico impide que las enzimas líticas del córtex la degraden durante la germinación, ya que esta estructura será la pared celular de la futura célula (Setlow, 2003).

1.2.6. Membrana interna o “inner membrane”

Al contrario que la membrana externa, la membrana interna es una barrera que juega un papel importante en la resistencia a muchos agentes químicos, en particular a aquellos que pueden dañar el DNA (Setlow, 2006).

A pesar de que la composición lipídica de esta envoltura no es inusual, las propiedades que presenta sí que lo son: los lípidos que la conforman presentan escasa movilidad, su viscosidad es mucho mayor que la de la membrana citoplasmática de las células vegetativas y su permeabilidad es extremadamente baja, incluso para moléculas pequeñas como el agua (Setlow, 2016). Se desconocen las razones por las que la membrana interna posee estas características, sin embargo, es previsible que tengan una enorme influencia en la resistencia de los esporos a diversas sustancias químicas, puesto que restringe el paso de estas moléculas hacia el interior, al protoplasto. Además, se ha observado que el mecanismo por el cual algunas sustancias oxidantes inactivan los esporos es dañando la membrana interna (Setlow, 2006).

Cabe destacar que esta envoltura se encuentra muy comprimida en el esporo latente y, que su volumen aumenta al doble en los primeros minutos de la germinación, incluso en ausencia de ATP, por lo que este aumento de volumen no se debe a la síntesis de nueva membrana (Cowan y col., 2004). Además, parece que los lípidos de esta membrana son resistentes a la extracción con detergentes y a condiciones capaces de degradar la membrana de células vegetativas (Setlow, 2011).

Por otro lado, se cree que la mayoría de las proteínas involucradas en la germinación se encuentran aquí, como es el caso de los receptores de la germinación (germinant receptors, GRs) así como de la proteína GerD, necesaria para el funcionamiento de los receptores (Hudson y col., 2001). En *B. subtilis* se han descrito principalmente los receptores GerA, que reconce la L-alanina, y los receptores GerB y GerK, ambos necesarios para desencadenar la germinación inducida por la combinación de asparagina, glucosa, fructosa y K⁺ (AGFK) (Setlow, 2003). El receptor GerB también reconoce la D-alanina. Además, en *B. subtilis* hay otros dos operones homólogos al *gerA* cuya función no se conoce. Griffiths y col. (2011) observaron que, en los esporos latentes, los receptores de la germinación y la proteína GerD se localizan en un mismo cluster llamado germinosoma, además la formación de este cluster es importante para el correcto funcionamiento de los receptores en respuesta a los nutrientes.

Por otro lado, se cree que el operon *spoVA*, responsable de la entrada de DPA al esporo durante la esporulación y puede que también de su salida durante la germinación, se localiza también en la membrana interna (Vepachedu y Setlow, 2005).

En resumen, esta envoltura resulta clave tanto en la resistencia de los esporos frente a diferentes agentes químicos, como en el proceso de germinación.

1.2.7. Protoplasto o “core”

Se encuentra en el centro del esporo y es análogo al citoplasma de las células vegetativas. Aquí es donde se localiza el DNA, los ribosomas y tRNAs (Setlow, 2006). El material genético, así como los enzimas presentes, son, en la mayor parte de los casos, idénticos a los de las células vegetativas, aunque también se encuentran en los esporos algunas moléculas únicas como el ácido dipicolínico y las proteínas SASP. El contenido de agua es también menor que en el protoplasto de las células vegetativas, mientras que en estas supone el 75-80% del peso del protoplasto, en los esporos se encuentra entre 27 y 50% dependiendo de la especie (Gerhardt, 1989). El contenido de agua en los esporos es tan bajo que se cree que es el motivo por el cual los enzimas están en estado inactivo. También parece estar relacionado con su elevada resistencia térmica (Gerhardt, 1989). Durante los primeros momentos de la germinación, el contenido en agua se eleva rápidamente facilitando la movilidad de las macromoléculas y con ello la actividad de los enzimas (Setlow, 2003).

El pH del protoplasto se reduce en el esporo hasta 6,5 aproximadamente, mientras que en las células vegetativas el pH es de alrededor de 7,8 (Setlow, 2013). Esta acidificación podría contribuir también a la inactividad de los enzimas.

En cuanto al ácido piridin-2,6-dicarboxílico (ácido dipicolínico, DPA), se trata de una molécula única de los esporos, que normalmente está quelada con cationes divalentes, principalmente de calcio. Supone el 5-15% del peso seco del esporo y tan solo se encuentra en el protoplasto (Setlow, 2006). Este compuesto se sintetiza en la célula madre y posteriormente pasa al esporo gracias a los canales *spoVA* localizados en la membrana interna. Durante la germinación se libera en los primeros minutos, aunque no se conoce con certeza a través de qué mecanismo. Es importante destacar que la concentración de DPA en el protoplasto está muy por encima de su solubilidad máxima, por tanto no se

conoce el estado en el que se encuentra en los esporos latentes (Setlow, 2006). Además, se cree que la presencia de DPA contribuye al bajo contenido en agua del protoplasto, así como a la resistencia frente a la radiación UV (Setlow, 2011; Slieman y Nicholson, 2001). Sin embargo, la implicación del DPA en la resistencia a la radiación UV, es motivo de controversia, ya que también se describió un posible efecto sensibilizante del DPA frente a esta tecnología (Paidhungat y col., 2000; Setlow, 1995). Esta discrepancia podría deberse a diferencias en la metodología, puesto que Slieman y Nicholson (2001) observaron que el DPA reducía la resistencia a la radiación UV-C en esporos mantenidos en una solución acuosa, pero la aumentaba frente a longitudes de onda entre 254 y 400 nm cuando se trataban los esporos en aire una vez deshidratados.

Además, se ha propuesto que el DPA podría contribuir al mantenimiento de la latencia de los esporos, puesto que se ha observado que esporos carentes de esta molécula germinarían de forma espontánea (Paidhungat y col., 2000).

Por otro lado, en los esporos el ADN se encuentra protegido por pequeñas proteínas solubles en ácido (SASPs) de tipo α/β , que se sintetizan en los últimos momentos de la esporulación, justo antes de la entrada de DPA, y se degradan al principio de la germinación. Si no se produce su degradación, su presencia influye notablemente en el posterior desarrollo, posiblemente bloqueando la transcripción del ADN (Setlow, 2006). Los esporos también contienen proteínas SAPS de tipo γ , aunque estas no se encuentran unidas al ADN (Setlow y col., 2000; Setlow, 1988).

La concentración de las proteínas SASPs es elevada, ya que suponen entre el 5 y el 15% del total de las proteínas del espora (Paidhungat y Setlow, 2002), siendo las de tipo α/β alrededor del 3% (Setlow, 2006). Se trata de proteínas compuestas por alrededor de 60-75 aminoácidos. Estas proteínas se encuentran codificadas por un grupo de entre 2 y 7 genes dispersos por todo el genoma, que se expresan en paralelo al final de la esporulación (Setlow, 2011). Las secuencias de estas proteínas están muy conservadas entre las especies de *Bacillus* y *Clostridium*, aunque no hay homólogos en las células vegetativas, y muestran estructuras muy diferentes a las de otras proteínas (Setlow, 2011).

Las SASPs de tipo α/β modifican notablemente la estructura y propiedades del ADN, lo que le hace más resistente tanto al calor como a sustancias químicas y radiación UV. Cualquier deficiencia en estas proteínas supone una mayor sensibilidad a distintos tratamientos, incluso a aquellos como el calor húmedo, cuyo mecanismo de acción no es

a priori el daño al ADN (Nicholson y col., 2000). Esta mayor sensibilidad podría deberse a alguna alteración leve en la esporulación, a cambios en la cubierta o a un menor efecto protector sobre el ADN (Setlow, 2011; Tennen y col., 2000; Young y Setlow, 2003).

Las proteínas de tipo γ parece que tan solo son empleadas para la obtención de aminoácidos durante la germinación, mediante su degradación (Setlow y col., 2009).

1.3. Ciclo vital de las especies esporuladas

Como se ha comentado anteriormente, las bacterias esporuladas tienen la capacidad de pasar a un estado ametabólico cuando las condiciones ambientales no son favorables. El proceso por el cual tiene lugar este cambio se llama esporulación y ha sido ampliamente estudiado, sobre todo en *B. subtilis*. Se cree que el motivo principal que desencadena la esporulación es la privación de nutrientes; cuando la concentración de nutrientes en el medio disminuye, la bacteria lo detecta y pone en marcha el mecanismo de esporulación. Sin embargo, este proceso es largo y supone un gran gasto energético, una vez iniciada, si las condiciones se vuelven favorables, un espora ametabólico estaría en desventaja frente al resto de células que no hayan iniciado la esporulación.

Se ha descrito que previamente a la esporulación, *B. subtilis* es capaz de producir y liberar un factor de muerte “killing factor” (*skf*) y una proteína de señalización (*sdp*), que actúan conjuntamente para bloquear la esporulación de células hermanas y producir su lisis. De esta manera, la célula obtiene nutrientes de las células lisadas (canibalismo), retrasando su propia esporulación, y asegurándose de las condiciones de falta de nutrientes antes de iniciar definitivamente la formación del espora (González-Pastor y col., 2003). Los genes que codifican estos factores están regulados por la proteína Spo0A, que es la que desencadena la esporulación. Se ha visto que, al inicio de la formación del espora, los operones *skf* y *sdp* son fuertemente inducidos. Además, la ausencia de estos operones da lugar a una esporulación más rápida y más homogénea (González-Pastor y col., 2003).

1.3.1. Fases de la esporulación

Tradicionalmente se han identificado siete etapas en la esporulación, aunque algunos procesos son simultáneos y, por tanto, es difícil distinguir la separación de las etapas (Tan y Ramamurthi, 2014) (Figura 1.4):

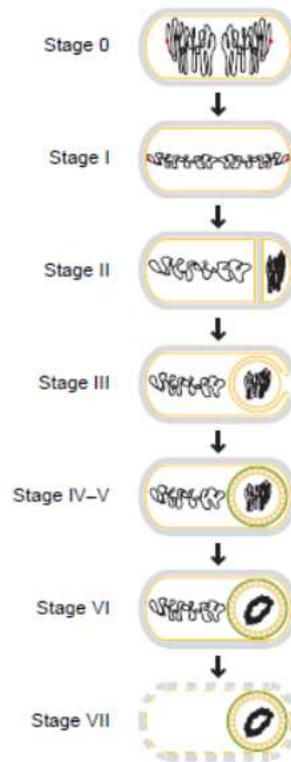


Figura 1.4. Fases de la esporulación (extraído de Tan y Ramamurthi (2014)).

- Fase 0: Esta fase corresponde al inicio del proceso de esporulación, cuando se produce la activación de la proteína reguladora Spo0A. Es aquí cuando tiene lugar el canibalismo antes descrito. La activación de Spo0A tiene lugar mediante la autofosforilación de cinco histidina-quinasas (KinA, KinB, KinC, KinD y KinE) que responderían a diferentes condiciones medioambientales estresantes. Sin embargo, exceptuando la ausencia de nutrientes, no se conocen las señales que detectan estas kinasas. Sí que se ha observado que el piruvato podría ser un ligando de KinD y su concentración extracelular podría influir en la esporulación (Wu y col., 2013).
- Fase I: Reordenación del ADN en forma de filamento axial y aseguramiento del número correcto de copias. Al comienzo de la esporulación, la célula precursora o esporangio contiene dos nucleoides (o cromosomas) idénticos, uno para la célula madre y otro para el espora. En esta etapa se produce la organización del material genético, formando, a diferencia de en el caso del crecimiento vegetativo, un filamento axial. En este cambio estructural participan dos proteínas, la RacA y la

DivIVA. La primera es necesaria para anclar los dos cromosomas a los polos de la célula (un cromosoma en cada polo) gracias a la interacción con la proteína DivIVA.

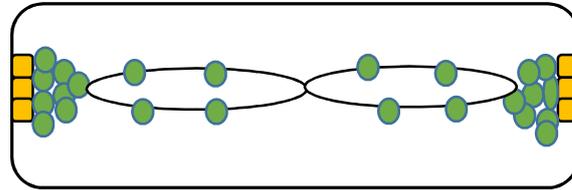


Figura 1.5. Formación del filamento axial durante la esporulación. En negro se representan los cromosomas, en verde la proteína RacA y en naranja la proteína DivIVA (Adaptado de Losick (2010)).

- Fase II: división celular asimétrica. Esta etapa es simultánea a la anterior y en ella es donde se forma el septo que diferenciará posteriormente la célula madre del preesporo. Es importante destacar que esta división es asimétrica, es decir, el septo se forma en un polo de la célula, en lugar de en el centro como ocurre en el crecimiento vegetativo. Dicha división asimétrica tiene lugar gracias a la proteína tubulina llamada FtsZ, que forma dos anillos llamados anillos Z que migran cada uno a un polo de la célula. Uno de esos anillos será el que forme el septo que divide las dos células, mientras que el otro se desintegrará (Figura 1.6).

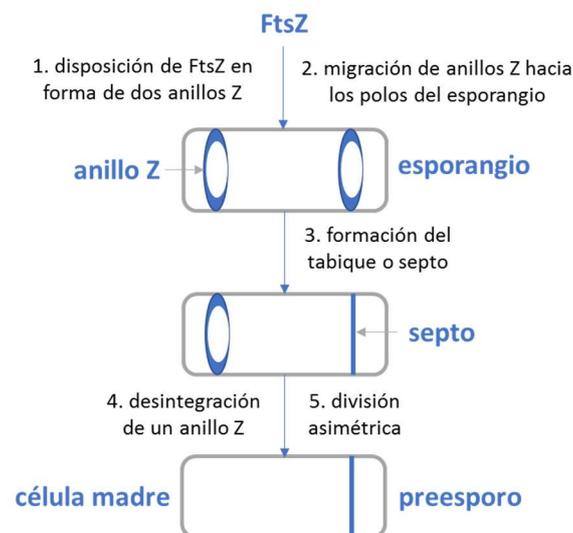


Figura 1.6. Formación del tabique por acción de la proteína FtsZ y consecuente división asimétrica (Extraído de Gil (2017)).

En cuanto al material genético, la distribución entre la célula madre y el preesporo es asimétrica durante al menos 15 minutos. Este fenómeno es conocido como asimetría genética temporal, que surge debido a que en el momento en el que el septo divide las dos células, tan solo una tercera parte del cromosoma del esporo se encuentra en él. Es posteriormente cuando la ADN-translocasa, localizada en dicho septo, impulsará el resto de DNA al interior del esporo. A partir de este momento se dispone de dos células adyacentes con un cromosoma cada una (Losick, 2010; Tan y Ramamurthi, 2014). Se cree que dicha asimetría genética temporal podría guardar relación con las actividades específicas de cada compartimento que ocurren durante la esporulación (Frandsen y col., 1999) (ver apartado siguiente: Factores de transcripción de la esporulación).

- Fase III: Endocitosis del preesporo por la célula madre. En esta fase la membrana de la célula madre envuelve al preesporo convirtiéndolo en una célula independiente en su interior.
- Fases IV, V y VI: Formación del córtex y la cubierta. La endocitosis de la fase anterior supone la formación de la membrana interna y externa del esporo, así como del córtex entre ambas membranas. Por último se forma la cubierta proteica en la parte más externa del preesporo (Losick, 2010). En estas fases, de manera paralela, tiene lugar la síntesis de ácido dipicolínico en la célula madre y su posterior traspaso al preesporo, así como la deshidratación del mismo que le conducirá a la formación del esporo maduro.
- Fase VII: Lisis de la célula madre. Una vez ha terminado el proceso de esporulación, la célula madre es lisada.

1.3.2. Factores de transcripción de la esporulación

La esporulación de *B. subtilis* está dirigida por la acción de cinco factores de transcripción, dos de ellos actúan en la célula madre, mientras que otros dos lo hacen en el preesporo. Ambas células siguen su propio programa de expresión genética para su diferenciación celular (Losick, 2010).

Estos factores de transcripción son el Spo0A y los factores sigma de la ARN polimerasa, σ^F , σ^E , σ^G y σ^K , que a pesar de producirse en la célula antes de la división asimétrica, no se activan hasta después de la formación del septo (Piggot y Losick, 2002).

Los genes bajo el control de σ^F y σ^G solo se expresan en el preesporo, mientras que los genes regulados por σ^E y σ^K tan solo lo hacen en la célula madre. Estos factores sigma tienen la función de unirse a la ARN polimerasa y dirigirla a ciertas secuencias de promotores en el cromosoma (Losick, 2010). Además, estos factores actúan de forma escalonada e intermitente entre la célula madre y el preesporo (Figura 1.7). En primer lugar se activa el factor sigmaF en el preesporo y, en segundo lugar, será el factor sigmaE el que se active en la célula madre. Después, tras la endocitosis del preesporo, el factor sigmaF es sustituido por el factor sigmaG y, por último, en la célula madre actúa el factor sigmaK.

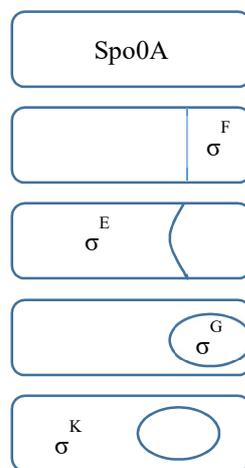


Figura 1.7. Secuencia de activación de los factores de transcripción sigma (adaptado de Losick (2010)).

Como se ha mencionado anteriormente, en primer lugar, es el factor de transcripción Spo0A el que inicia la esporulación, previsiblemente ante la falta de nutrientes. Esta proteína es la que pone en marcha toda la maquinaria que conduce a la esporulación, incluyendo la división asimétrica de la célula. Se ha descrito que el modo en el que esta proteína altera la transcripción es mediante su acumulación en la célula, así como su estado de fosforilación (Piggot y Losick, 2002). Las principales dianas de la activación transcripcional de Spo0A son el gen *spoIIE* y los operones *spoIIA* y *spoIIG*, ya que son los que codifican los factores de transcripción sigma σ^F y σ^E .

La proteína SpoIIE, bajo el control de Spo0A, es necesaria para el posicionamiento asimétrico de los anillos Z (FtsZ) y es degradada después de la división en la célula madre, pero se mantiene durante más tiempo en el preesporo. Una vez esta

división ha tenido lugar, entra en funcionamiento el factor de transcripción σ^F que, para poder actuar, primero tiene que activarse. El factor sigmaF se encuentra tanto en la célula madre como en el preesporo en una forma inactiva formando un complejo con la proteína SpoIIAB, que actúa como un factor anti-sigma. En la célula madre este complejo permanece así, por lo que el factor sigmaF está siempre inactivo. Sin embargo, en el preesporo, en primer lugar la fosfatasa SpoIIE (localizada en el septo que divide ambas células) desfosforila la proteína SpoIIAA, que queda libre para reaccionar con el complejo SpoIIAB- σ^F , liberando el factor de transcripción sigmaF, y por tanto, activándolo (Figura 1.8). Cabe destacar que, aunque la fosfatasa SpoIIE está presente tanto en la célula madre como en el preesporo, el factor sigmaF solo se activa en el preesporo. Este fenómeno parece deberse a la localización de dicha fosfatasa en el septo, que estaría orientada hacia el preesporo.

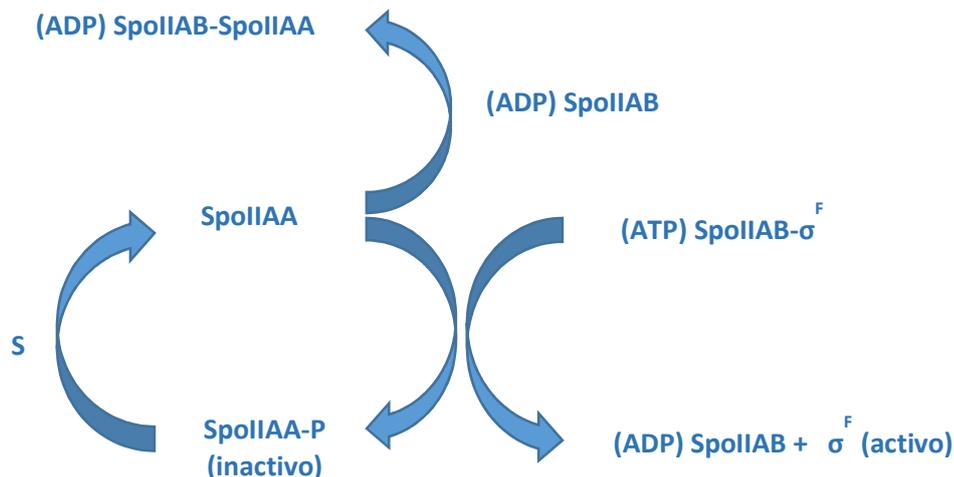


Figura 1.8. Ciclo de activación del factor de transcripción σ^F (adaptado de Piggot y Losick (2002)).

Como se ha mencionado anteriormente, la activación del factor de transcripción sigmaF, desencadena después la activación del factor sigmaE en la célula madre, y esta a su vez activa el factor sigmaG en el preesporo y, por último, el preesporo enviará señales para activar el factor sigmaK en la célula madre. Estos fenómenos escalonados son un ejemplo de comunicación entre células.

El factor sigmaE se encuentra en la membrana en estado inactivo (pro- σ^E) y necesita liberarse de la secuencia pro para activarse. En dicha activación participa el

enzima SpoIIIGA, que se localiza también en la membrana, en el lugar de división entre las dos células. Este enzima se encuentra en estado inactivo y requiere de la unión al ligando SpoIIR, liberado del preesporo por acción del factor sigmaF, para activarse debido a un cambio conformacional. Este cambio hace que el enzima actúe sobre el complejo pro- σ^E , liberando este último (Piggot y Losick, 2002; Tan y Ramamurthi, 2014).

En cuanto al factor sigmaG, es el único que es sintetizado en el momento de actuación, tras el proceso de endocitosis y su activación depende de metabolitos liberados de la célula madre (Tan y Ramamurthi, 2014).

Por último, el factor sigmaK se encuentra en forma pro- σ^K inactiva y necesita de la actuación de una proteína, liberada tras la activación de factor sigmaG, para liberarse y poder actuar (Piggot y Losick, 2002; Tan y Ramamurthi, 2014).

A pesar de que todavía se desconocen algunos aspectos de la esporulación, parece evidente que ambas células, célula madre y preesporo, se comunican entre sí desencadenando la activación de los distintos factores sigma. Además, estos factores están muy controlados en cuanto a concentración y actividad, ya que se encargan de regular gran cantidad de genes que darán como resultado la formación del esporo.

1.3.3. Etapas de la germinación

Los esporos pueden sobrevivir en el estado ametabólico durante años, sin embargo, cuando las condiciones medioambientales son las adecuadas, pueden volver al estado metabólico a través del proceso conocido como germinación. Se entiende por germinación el periodo que comienza con la adición de un compuesto desencadenante de la germinación, y continúa con una serie de reacciones irreversibles, como la hidratación del protoplasto, con la pérdida de resistencia a diferentes agentes físicos y químicos (Paidhungat y Setlow, 2002). Para que la germinación tenga lugar, tradicionalmente se ha aceptado que el esporo no necesitaría energía metabólica directa, es decir, no consumiría ATP. Sin embargo, un estudio reciente contradice esta hipótesis (Sinai y col., 2015).

En la naturaleza, es previsible que lo que desencadene la germinación sea la presencia de nutrientes, conocidos como germinantes nutritivos, que son específicos de cada especie y cepa. Estos germinantes incluyen algunos aminoácidos, azúcares y derivados de purina, así como la combinación de varios nutrientes (AGFK) (Paidhungat

y Setlow, 2002; Setlow, 2003). La L-alanina también es un germinante bastante común entre los esporos de *Bacillus*.

Se ha observado que existe una gran heterogeneidad en la velocidad de germinación de los diferentes esporos individuales de una misma población, que se podría deber a la concentración de nutrientes en el medio o a la cantidad de receptores de la germinación presentes en cada espora, entre otros (Setlow y col., 2012).

Sin embargo, algunos esporos no responden a los germinantes nutritivos, a estos esporos se les llama esporos superlatentes y requieren de un tratamiento previo de “activación” para poder germinar.

De forma general, el proceso de germinación se divide en tres etapas: activación, fase I y fase II. Tras la germinación tiene lugar la fase de “outgrowth” o fase de desarrollo (Figura 1.9).

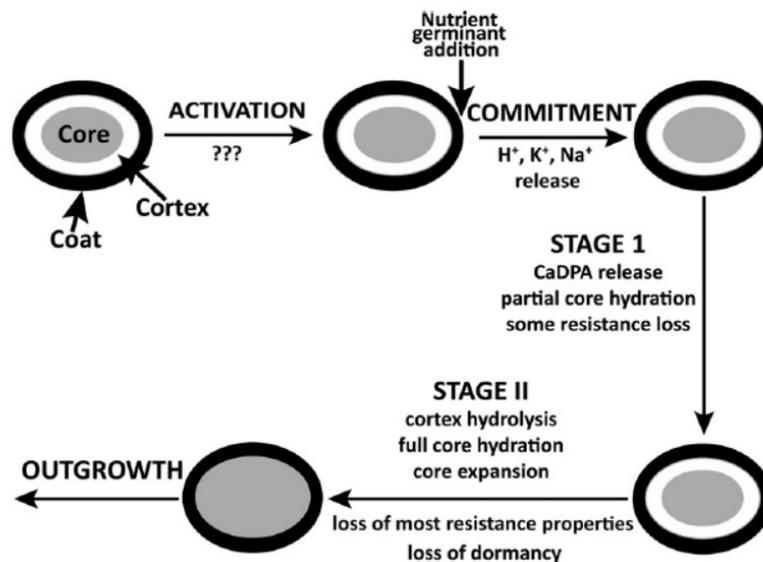


Figura 1.9. Eventos producidos en la germinación y desarrollo de los esporos (extraído de Setlow (2014)).

1.3.3.1. Activación

Se considera activación a aquellos tratamientos que ocasionan algún cambio en los esporos antes de la germinación y que los ponen en disposición de germinar de una forma más eficiente y sincronizada. Este proceso no requiere actividad metabólica y se cree que podría estar relacionado con algún cambio en la estructura de las proteínas (Setlow y col., 2012), aunque el mecanismo exacto no se conoce.

La activación se ha descrito como un proceso reversible, en el que los esporos mantienen su extraordinaria resistencia y sus propiedades de refringencia y ausencia de tinción (Berg y Sandine, 1970). Sin embargo, no está claro si se trata de un proceso completamente reversible o, si por el contrario, se produce algún cambio irreversible en algún componente del espora.

Muchos esporos son capaces de germinar adecuadamente en presencia de nutrientes, sin necesitar de procesos de activación para ello. Sin embargo, se ha observado que la activación reduce el tiempo entre la adición del nutriente y el inicio de la germinación (Paidhungat y Setlow, 2002). Por otro lado, los esporos superlatentes no son capaces de germinar de forma natural en presencia de nutrientes, pero en cambio sí responden a los nutrientes tras un tratamiento de activación.

El proceso de activación más empleado y estudiado es el tratamiento térmico a temperaturas subletales (Curran y Evans, 1945; Setlow, 2013), pero también se han descrito otros tratamientos de activación como la exposición a la acidez o a agentes reductores (Keynan y col., 1964).

Se ha observado que la activación térmica ejerce efecto principalmente sobre la germinación con nutrientes, por lo que se ha sugerido que el mecanismo de activación podría estar relacionado con una mayor accesibilidad de los nutrientes a los receptores de la germinación (Setlow, 2014). Sin embargo, no se sabe cómo se produce dicha mayor accesibilidad. Podría deberse a un cambio conformacional reversible de alguna proteína, pero no se han identificado hasta la fecha proteínas específicas afectadas por la activación térmica (Setlow, 2014). También se ha propuesto que la rotura de puentes de hidrógeno o de enlaces disulfuro de algunas proteínas podría ser la causa de la activación térmica (Zhang y col., 2009).

Otra teoría propuesta sugiere que la activación podría cambiar el estado del protoplasto: en los esporos latentes estaría en estado vítreo (glass-state) y pasaría a un estado gomoso (rubbery-state) tras la activación térmica (Sapru y Labuza, 1993). Sin embargo, esta teoría no ha sido comprobada.

Hashimoto y Conti (1971) observaron que durante la activación térmica y química se producían algunos cambios estructurales en la cubierta de los esporos, como la desnaturalización y liberación de algunas proteínas. Este fenómeno podría favorecer la entrada de los germinantes a los receptores de la germinación. Alimova y col. (2006)

observaron también que los tratamientos térmicos subletales producían la liberación de proteínas y también ácido dipicolínico (DPA). Beaman y col. (1988) estudiaron el efecto de la activación térmica en *Geobacillus stearothermophilus* y observaron que tras un choque térmico los esporos liberaban la totalidad de DPA y se modificaban sus propiedades de permeabilidad, lo que daba lugar a una menor densidad. Dado que se ha propuesto la implicación del DPA en el mantenimiento de la latencia (Paidhungat y col., 2000), el hecho de que se haya observado que la activación térmica podría producir la liberación de DPA, sugiere un nuevo mecanismo de activación. Sin embargo, si la activación actuase liberando DPA, este sería un proceso irreversible y no reversible como se ha definido hasta la fecha. No obstante, también se ha descrito que la pérdida de viabilidad de *G. stearothermophilus* precede a la liberación del DPA (Huesca-Espitia y col., 2016).

En definitiva, el mecanismo exacto por el que la activación pone a los esporos en disposición de germinar no se conoce. Podría ser un mecanismo diferente para cada especie; mientras que en *G. stearothermophilus* se liberaría DPA, esto no ocurre en otras especies (Beaman y col., 1988). También podría ser diferente a nivel individual en cada esporo, ya que en una misma población conviven esporos con facilidad para germinar y esporos que necesitan de un tratamiento previo para ello, esto podría deberse a diferencias estructurales que podrían ser modificadas con dichos tratamientos. En cualquier caso, pese a que el proceso de activación ha sido estudiado ampliamente, dada su importancia para la industria alimentaria, todavía no sabemos en qué consiste.

1.3.3.2. Fase I germinación

La germinación inducida por nutrientes se inicia tras la unión esteroespecífica de los nutrientes a los receptores de la germinación (GRs), localizados en la membrana interna del esporo. Cabe destacar que, dado que los receptores se han localizado en la membrana interna, los nutrientes tendrían que atravesar varias capas hasta llegar a su lugar de acción.

Tras la unión de los nutrientes a los receptores de la germinación, hay un breve periodo de tiempo en el que el proceso es reversible, es decir si se retirasen los nutrientes, los esporos no continuarían con la germinación. Después de ese periodo, los esporos quedan comprometidos a continuar con la germinación, incluso si se retirasen los

nutrientes. A este punto se le conoce como “commitment” o compromiso (Yi y Setlow, 2010).

Tras el compromiso de los esporos, el primer fenómeno que ocurre en la germinación es la liberación de Zn^{2+} y H^+ (Foster y Johnstone, 1986; Paidhungat y Setlow, 2002). Los esporos contienen gran cantidad de cationes divalentes, ya que los acumulan durante la esporulación, y contienen iones H^+ debido a la acidificación que tiene lugar también durante la esporulación. Sin embargo, no se conoce el mecanismo por el que son liberadas estas moléculas, ni la función que tiene. Aunque la liberación de iones H^+ es previsible que produzca la alcalinización del espora y esto podría ser esencial para la acción de algunas enzimas involucrados en la germinación.

Por ejemplo, se conoce que gracias a dicha alcalinización el espora es capaz de utilizar moléculas acumuladas en el espora latente, como el ácido 3-fosfoglicérico (3PGA). La utilización de esta molécula está regulada por el enzima fosfoglicerato mutasa, que permanece inactivo en el espora latente debido a la acidificación del protoplasto. La acidificación evita su unión a los iones Mn^{2+} , esenciales para la actividad del enzima, pero una vez se ha producido la alcalinización, el enzima se activa (Jedrzejak y col., 2000a, b; Magill y col., 1996).

En segundo lugar, se produce la liberación de ácido dipicolínico (DPA), así como los cationes divalentes que lleva asociados, y la entrada de cierta cantidad de agua en el espora. Estos eventos contribuyen también a la actividad enzimática del espora y podrían también iniciar la actividad metabólica, sin embargo, esto último no ha sido probado.

La salida de iones y DPA del espora parece que no está relacionada con energía metabólica generada ni por el catabolismo de germinantes exógenos ni reservas endógenas, por lo que se trata casi con toda seguridad de procesos pasivos (Paidhungat y Setlow, 2002).

Por otro lado, en esta fase tiene lugar la degradación de las proteínas SASP, dando como resultado aminoácidos libres que serán empleados en la etapa de desarrollo (outgrowth) para la síntesis de nuevas proteínas, así como para obtener energía. Este fenómeno también libera al ADN de las proteínas SASP, por lo que queda disponible para la transcripción (Driks, 2002; Paidhungat y Setlow, 2002; Setlow, 1988). La degradación de las proteínas SASP parece ser un proceso más lento que la degradación del córtex, sin embargo no se requiere de este último proceso para que se produzca la hidrólisis de dichas

proteínas (Paidhungat y Setlow, 2002). La degradación de las proteínas SASP podría iniciarse en la fase I de la germinación, mientras que no se completaría hasta ya avanzada la fase II. La proteína encargada de hidrolizar las proteínas SASP es la endoproteasa Gpr, que es específica de dichas proteínas. La endoproteasa Gpr es sintetizada en su forma inactiva (P₄₆) en el preesporo a la vez que se sintetizan las proteínas SASP. Tras una o dos horas después de su síntesis, se transforma en la forma P₄₁, que es activa *in vitro* pero no *in vivo* en el esporo, previsiblemente debido al bajo contenido de agua (Setlow, 2007).

En cualquier caso, en esta etapa se ha descrito que los esporos sufren una pequeña pérdida de resistencia al calor, principalmente debida al mayor contenido en agua del esporo. Sin embargo, este fenómeno no ha sido estudiado con detalle.

1.3.3.3. Fase II germinación

La salida de ácido dipicolínico en la fase anterior desencadena la hidrólisis del córtex, ya que este compuesto activa los enzimas líticos del córtex. Este es el evento que caracteriza principalmente la fase II de la germinación. La hidrólisis se lleva a cabo por una serie de proteínas que degradan específicamente el peptidoglicano del córtex y no de la pared celular, ya que reconocen el ácido δ -lactámico murámico presente en el córtex (Moir y Cooper, 2015).

Gracias a la hidrólisis del córtex se produce la expansión del protoplasto, lo que permite la entrada de más agua, alcanzándose un nivel de hidratación similar al de una célula vegetativa (Moir y Cooper, 2015; Paidhungat y Setlow, 2002). La expansión del protoplasto conlleva también la expansión de la membrana interna; esto parece que se produce en ausencia de síntesis de membrana nueva, probablemente debido a que la membrana interna en el esporo latente está comprimida (Paidhungat y Setlow, 2002). Además, también con la hidratación y expansión, los lípidos y proteínas de la membrana interna recobran su movilidad (Moir y Cooper, 2015).

En cuanto a la pared celular, también es necesario que se expanda para hacer frente al aumento de volumen del protoplasto. Sin embargo, no se conoce el mecanismo por el que esto sucede, aunque no necesitaría metabolismo energético para ello (Paidhungat y Setlow, 2002).

Al final de esta etapa se considera que el esporo ha perdido la latencia, así como la resistencia al calor, que a partir de este momento es similar a la resistencia de una célula vegetativa (Moir y Cooper, 2015).

Sinai y col. (2015) observaron que, al contrario de lo que se creía, durante la germinación, tras la salida de DPA, tiene lugar la síntesis de algunas proteínas. De hecho, la síntesis de proteínas sería necesaria para que la germinación tuviera lugar. Esta hipótesis fue rechazada por Korza y col. (2016) quienes observaron que al degradar $\geq 95\%$ del rARN de los esporos, estos eran capaces de germinar de forma similar a los esporos nativos, por lo que propusieron que la germinación no necesitaría la síntesis de ninguna proteína. Sin embargo, Sinai y Ben-Yehuda (2016) pusieron en duda tanto la metodología empleada como las conclusiones derivadas del estudio de Korza y col. (2016).

La Figura 1.10 muestra la secuencia de eventos que tendrían lugar durante la germinación según Sinai y col. (2015).

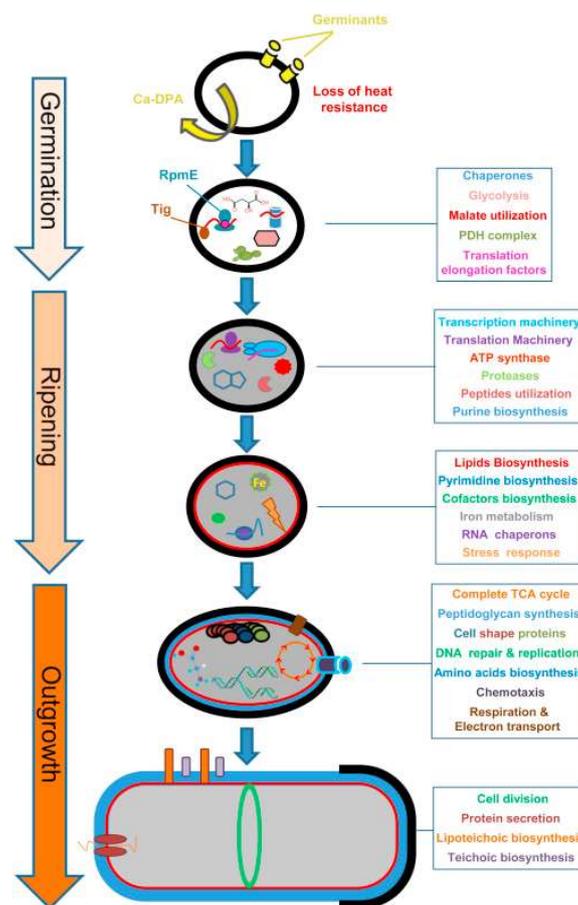


Figura 1.10. Secuencia de eventos que tienen lugar en la germinación y desarrollo de los esporos según Sinai y col. (2015) (extraído de Sinai y col. (2015)).

1.3.3.4. Fase de desarrollo (outgrowth)

La fase de desarrollo empieza tras la germinación, sin embargo, estas dos fases pueden superponerse. Esto quiere decir que es posible encontrar eventos de la etapa de desarrollo, como la iniciación del metabolismo, de forma simultánea a eventos específicos de la germinación, como la hidrólisis del córtex (Paidhungat y Setlow, 2002).

En esta fase es cuando tradicionalmente se había asumido que tenía lugar la síntesis de proteínas, aunque como se ha comentado anteriormente, este tema está en controversia. En cualquier caso, tampoco se conocía qué condicionaba la secuencia de síntesis de las diferentes proteínas, aunque sí se sabía que cada una se sintetizaba en un determinado momento. Se sugirió que podría venir determinado por la localización de los genes dentro del cromosoma, pero había evidencias que contradecían esta hipótesis. Por otro lado, Sinai y col. (2015) encontraron que el 33% de las proteínas que se sintetizaban durante los primeros momentos de la germinación correspondía al proteoma de reactivación de los esporos, lo que demostraba la rápida reactivación del metabolismo. Esto incluía los componentes del protoplasto de la maquinaria de transcripción y traducción, así como un grupo de chaperonas, que aseguraba el correcto plegamiento de las proteínas. También detectaron al mismo tiempo los componentes de generación de energía, como la síntesis de ATP, la ruta metabólica de glicolisis y el enzima piruvato deshidrogenasa. También en esta fase se sintetizarían los componentes de la ruta metabólica del malato, incluyendo los enzimas que convierten el malato en piruvato a través de una descarboxilación oxidativa.

Segev y col. (2013) incluyeron una nueva etapa al inicio de la fase de desarrollo, conocida como maduración o “ripening”, que se extiende desde la germinación hasta el momento en el que empieza la elongación de la célula en desarrollo. En este periodo el espora se dedica a reorganizar sus moléculas, entre otras funciones. Estos autores también encontraron que la duración de esta etapa depende de los recursos de los que disponga el espora, es decir, el tiempo de maduración correspondería al tiempo en el que el espora sintetiza y ensambla el rARN. Si el espora ha sido almacenado a temperaturas elevadas (en torno a 50°C), se produce una degradación del rARN y, en consecuencia, se alarga la fase de maduración.

Por otro lado, con el aumento de volumen del espora cuando empieza su elongación, es necesario que se sintetice nueva membrana y pared celular. Parece que la

síntesis de la pared celular en esta etapa es similar a la síntesis de pared celular en una célula vegetativa, aunque debe haber algunas particularidades en esta etapa. Estas particularidades son evidentes ya que en esta etapa las células pasan de la forma esférica de los esporos a una forma cilíndrica de célula vegetativa, aunque el mecanismo por el que ocurre esto no se conoce (Paidhungat y Setlow, 2002). Algunos autores han sugerido que podría estar relacionado con una proteína de unión a penicilina (PBP 2a) (Murray y col., 1998; Sauvage y col., 2008).

Por último, tiene lugar la eliminación de la célula de las estructuras que envuelven el espora. Este proceso ha sido relacionado con el exosporio, que está formado por dos estructuras y que durante la germinación se abre para facilitar la salida de la célula del exosporio (Steichen y col., 2007). Por otro lado, en *Clostridium sporogenes*, Brunt y col. (2015) observaron que durante la germinación, la apertura de la cubierta se formaba de forma adyacente a la apertura del exosporio, sugiriendo que la localización de estas aperturas podría estar condicionada genéticamente en el espora latente. Sin embargo, esta hipótesis no ha sido probada.

1.3.4. Factores de la germinación

La germinación es un proceso complejo y único, que depende de genes específicos, los genes *ger*, que se han identificado a través de mutaciones. Los esporos también disponen de diversos mecanismos para llevar a cabo los distintos procesos que tienen lugar en la germinación.

Para que la germinación por nutrientes tenga lugar se necesitan una serie de proteínas:

1.3.4.1. Receptores de la germinación (GRs)

Los esporos contienen normalmente múltiples GRs, cada uno de ellos es específico de uno o varios germinantes. Todos los GRs se sintetizan en el espora al final de la esporulación y se localizan en la membrana interna (Paredes-Sabja y col., 2011). La cantidad de GRs en los esporos no es muy elevada, probablemente tan solo contienen decenas de GRs para cada germinante.

En *B. subtilis* se han identificado principalmente tres operones tricistrónicos (*gerA*, *gerB* y *gerK*) cuya ausencia bloquea la germinación en los primeros momentos,

antes de la liberación de DPA y la entrada de agua (Moir y Smith, 1990; Paidhungat y Setlow, 2002).

El operon *gerA* se ha identificado como el responsable de la germinación inducida por L-alanina, ya que, en ausencia de alguno de sus tres genes, se reduce la germinación con este aminoácido. El operon *gerA* está formado por las proteínas GerAA, GerAB y GerAC. Parece que las proteínas GerAA y GerAB son proteínas integrales de membrana, mientras que la proteína GerAC sería una proteína periférica de membrana (Paredes-Sabja y col., 2011).

Los operones *gerB* y *gerK* en *B. subtilis* son los responsables de la germinación inducida por la combinación AGFK (asparagina, glucosa, fructosa y potasio) y las tres proteínas codificadas por estos dos operones contienen una secuencia similar a las proteínas codificadas por el operon *gerA* (Paidhungat y Setlow, 2002).

Por otro lado, no todas las bacterias formadoras de esporos contienen los mismos receptores de la germinación. Por ejemplo, en algunos esporos como *Clostridium difficile* y *Clostridium bartlettii* no se ha encontrado ninguno, mientras que otras especies de *Clostridium* contienen un solo gen que codifica la subunidad GR A. Es posible que en algunos esporos solo sea necesaria la subunidad GR A para la germinación, o podría ser que esta proteína se asociase con otras proteínas desconocidas (Paredes-Sabja y col., 2011).

1.3.4.2. Proteína GerD

La proteína GerD se encuentra en la membrana interna del espora a niveles de 1000 moléculas por espora. Esta proteína es esencial en la germinación inducida por nutrientes en *B. subtilis*. Sin embargo, a pesar de estar presente en casi todas las especies de *Bacillus*, no se ha encontrado ningún homólogo de GerD en ninguna especie de *Clostridium* (Paredes-Sabja y col., 2011; Setlow, 2014).

En esporos mutantes de *Bacillus* carentes de esta proteína, se ha observado que la germinación inducida por nutrientes es mucho más lenta que en la cepa parental (Setlow, 2014). Además la ausencia de GerD también produce la rotura del cluster GR, el germinosoma, de modo que los receptores de la germinación se encuentran dispersos por toda la membrana interna, en lugar del encontrarse agrupados (Pelczar y col., 2007; Setlow, 2014).

Se ha sugerido que el mecanismo de acción de esta proteína podría ser la regulación positiva de la formación de receptores de la germinación, o aumentar la actividad de los receptores a nivel individual. Sin embargo, se ha comprobado que al construir cepas con diez o veinte veces más receptores de la germinación, no se compensa la deficiencia de la proteína GerD, por lo que la hipótesis no sería válida (Pelczar y col., 2007).

1.3.4.3. Proteínas SpoVA

Se ha observado que las proteínas codificadas por los genes *spoVA* son las responsables de la entrada de ácido dipicolínico en el espora durante la esporulación. Además, la expresión de estos genes en el preespora tiene lugar al mismo tiempo que los genes de los receptores de la germinación y de la proteína GerD. Por otro lado, casi todas las bacterias formadoras de esporos de *Bacillus* y *Clostridium* contienen proteínas SpoVA, aunque solo unas pocas están conservadas en todas ellas (Setlow y col., 2017).

La localización de estas proteínas probablemente sea la membrana interna, bien como proteínas integrales o periféricas, y la cantidad es aproximadamente seis veces la de receptores de la germinación (Stewart y Setlow, 2013).

Estas proteínas han sido también relacionadas con la salida de DPA del espora en la germinación; de hecho, parecen ser las únicas candidatas (Vepachedu y Setlow, 2007b). Existen varias evidencias que sugieren la participación de las proteínas SpoVA en la salida de DPA: i) esporos con una mutación termosensible en los genes *spoVA* son capaces de captar DPA en la esporulación a temperaturas permisivas, pero no son capaces de germinar a temperaturas no permisivas (Vepachedu y Setlow, 2004); ii) esporos mutantes con cuatro veces más proteínas SpoVA liberan Ca-DPA más rápido que la cepa parental durante la germinación (Vepachedu y Setlow, 2007b); iii) la proteína SpoVAC actúa como un canal mecanosensitivo en *Escherichia coli*, además se ha visto que la dodecilamina o cambios en la tensión de membrana pueden abrir los canales de SpoVAC en vesículas lipídicas (Velásquez y col., 2014); iv) esporos de *B. subtilis* carentes de la proteína SpoVAEa son capaces de captar Ca-DPA en la esporulación de forma normal, pero su liberación en la germinación inducida por nutrientes es más lenta que en la cepa parental (Perez-Valdespino y col., 2014); v) se ha encontrado un elemento transponible, que contiene homólogos de *spoVA* y otras posibles proteínas de la membrana interna en

B. subtilis, que causa reducciones en la velocidad de germinación con nutrientes y dodecilamina (Krawczyk y col., 2016).

La liberación de DPA no requeriría energía, al contrario que su entrada en el preesporo durante la esporulación (Setlow, 2003). Sin embargo, no se sabe cómo funcionan estas proteínas para permitir la entrada de DPA en el esporo durante la esporulación, ni su liberación en la germinación. Además, tampoco conocemos el mecanismo por el que se regula la liberación de este compuesto, aunque podría estar relacionada con cambios en la tensión de la membrana interna (Setlow y col., 2017). Por otro lado, las proteínas SpoVA podrían ser componentes integrales de los canales de Ca-DPA o podrían ser proteínas que solo actuarían en los canales de Ca-DPA para influir en su función (Vepachedu y Setlow, 2007b).

Tampoco se conoce cómo la unión de los nutrientes a los receptores de la germinación inducen la salida de Ca-DPA del esporo, aunque hay indicios de una posible interacción entre los receptores de la germinación con las proteínas SpoVA (Vepachedu y Setlow, 2007a).

1.3.4.4. Enzimas líticos del córtex (CLEs)

Para poder completar la fase II de germinación, los esporos tienen que hidrolizar el córtex para poder seguir adelante con la germinación y el posterior desarrollo. Para ello, contienen varios enzimas, conocidos como enzimas líticos del córtex. La hidrólisis del córtex da lugar a una mayor hidratación del protoplasto, así como a la pérdida de resistencia. A efectos prácticos, a partir de este momento es cuando el esporo pierde la latencia.

Existen dos tipos de enzimas: los enzimas líticos del córtex (CLEs), que degradan el peptidoglicano intacto, y los enzimas líticos de fragmentos de córtex (CFLEs), que hidrolizan los fragmentos generados por los CLEs (Popham y Bernhards, 2015). Ambos tipos de enzimas tan solo actúan en presencia de ácido δ -lactámico murámico; de esta manera los esporos controlan la degradación del peptidoglicano del córtex, dejando intacta la pared celular.

Las especies de *Bacillus* poseen dos enzimas líticos del córtex, CwlJ y SleB. Estos enzimas son parcialmente redundantes, es decir, la ausencia de uno de los dos es compensada con la presencia del otro. Esto quiere decir que el esporo es capaz de

germinar en ausencia de uno de ellos pero no en ausencia de ambos (Popham y Bernhards, 2015; Setlow, 2003).

El gen *sleB* se expresa bajo el control del factor σ^G , lo que indica que es sintetizado en el preesporo (Boland y col., 2000), y se encuentra en una forma madura pero inactiva en el esporo latente. En cuanto a la localización de este enzima dentro del esporo, se ha encontrado tanto en la membrana interna como en las capas externas (cubierta, córtex y membrana externa) (Chirakkal y col., 2002). También se ha sugerido que la localización de estos enzimas podría intervenir en su resistencia a diversos agentes; el enzima SleB es más resistente tanto al calor, como a sustancias alcalinas, por lo que podría encontrarse protegido por otras proteínas como YpeB (Chirakkal y col., 2002). El enzima SleB posee actividad transglicosilasa catalizando la rotura de los enlaces glucosídicos entre los residuos de ácido N-acetilmurámico (NAM) y N-acetilglucosamina (Li y col., 2012). Sin embargo, no se conoce cómo se activa este enzima durante la germinación.

Por otro lado, el gen *cwlJ* es un gen específico de la esporulación expresado en la célula madre bajo el control del factor σ^E (Ishikawa y col., 1998; Popham y Bernhards, 2015). Este enzima es activado por Ca-DPA, bien endógeno o exógeno (Paidhungat y col., 2001). Ragkousi y col. (2003) observaron que la proteína de la cubierta YwdL es esencial para la funcionalidad del enzima CwlJ, bien porque es necesaria para su actividad o, porque lo ancla de alguna manera a la cubierta del esporo, por lo que propusieron cambiar el nombre a GerQ, por su implicación en la germinación. La localización del enzima CwlJ es, por tanto, la cubierta del esporo, por lo que se pierde con tratamientos que retiran esta envoltura, o en esporos mutantes en el gen *cotE* (Bagyan y Setlow, 2002).

Además, en las especies de *Bacillus* también hay enzimas líticos de fragmentos de córtex, como el enzima SleL (YaaH). Este enzima se expresa en la célula madre bajo el control del factor σ^E (Popham y Bernhards, 2015). Parece que su localización sería en el exterior del córtex, ya que se ha observado que se elimina con procedimientos para retirar el coat de los esporos (Chen y col., 2000). Su actividad enzimática es diferente en cada especie de *Bacillus*, por ello se le conoce con distintos nombres; en *B. subtilis* y *B. megaterium* el enzima YaaH posee actividad epimerasa, mientras que en *B. cereus* y *B. anthracis* muestra actividad N-acetilglucosaminidasa (Popham y Bernhards, 2015).

En esporos de *Clostridium* se han encontrado enzimas homólogas de SleB y CwlJ, sin embargo, no está clara su implicación en la germinación, ya que esporos carentes de

estos enzimas no muestran diferencias en la germinación (Popham y Bernhards, 2015). Pero se ha visto que el enzima SleC es el enzima lítico del córtex principal de estos esporos, ya que parece ser el único necesario para completar la germinación (Burns y col., 2010). Algunas especies de *Clostridium* poseen también un segundo enzima lítico conocido como SleM, sin embargo, este enzima no es esencial para que se complete la germinación, aunque esporos carentes de SleC y SleM muestran mayor deficiencia en la germinación que esporos carentes solo del enzima SleC (Paredes-Sabja y col., 2009). Por otro lado, parece que ninguno de los dos enzimas responden al Ca-DPA (Paredes-Sabja y col., 2009), por lo que la germinación inducida por este compuesto en estos esporos tiene lugar por un mecanismo desconocido.

En cualquier caso, quedan preguntas pendientes en este campo, como el mecanismo por el cual los enzimas líticos de córtex se mantienen inactivos y estables en el espora latente, y los procesos por los cuales se activan durante la germinación. Un conocimiento más profundo de estas cuestiones podría establecer estos enzimas como dianas celulares para conseguir una germinación más eficiente, siendo necesarios tratamientos más suaves para inactivar los esporos.

1.3.5. Otros mecanismos de germinación

Pese a que es previsible que lo que desencadene la germinación de los esporos en la naturaleza sea la presencia de nutrientes, se han encontrado otras vías de germinación (Figura 1.11). Estas incluyen tanto tratamientos químicos como la adición de Ca-DPA exógeno o enzimas, como tratamientos físicos como las altas presiones hidrostáticas.

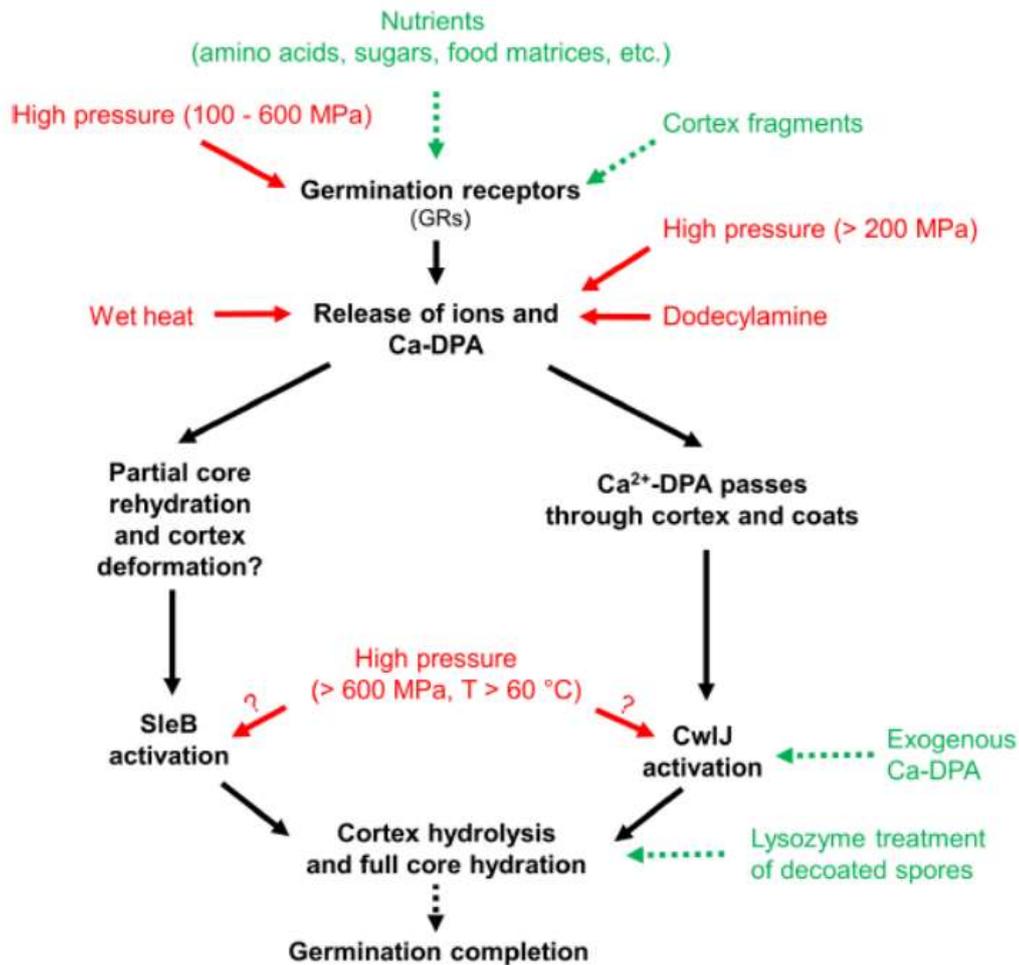


Figura 1.11. Esquema de rutas de germinación en *B. subtilis* donde se muestran en verde los estímulos que desencadenan la germinación y, en rojo, posibles vías de inactivación (Zhang y Mathys, 2018).

1.3.5.1. Germinación inducida por Ca-DPA

Como se ha comentado anteriormente, el enzima lítico del córtex CwlJ se activa en especies de *Bacillus* por el Ca-DPA que se libera del protoplasto del espora durante la germinación. Pero también puede activarse con Ca-DPA exógeno, puenteando la fase I de la germinación. Es decir, en este caso no serían necesarios ni los nutrientes, ni los receptores de la germinación (Ragkousi y col., 2003), sino que el compuesto actuaría directa e independientemente causando la hidrólisis del córtex.

1.3.5.2. Germinación inducida por altas presiones hidrostáticas

En cuanto a la germinación inducida por altas presiones, se han observado dos mecanismos. Por un lado, presiones entre 100 y 300 MPa parece que desencadenan la germinación por el mismo mecanismo que los nutrientes, por lo que podrían actuar introduciendo cambios conformacionales en los sitios de unión de los receptores de la germinación (Wuytack y col., 2000). Por otro lado, la germinación inducida a 600 MPa no necesita de los receptores de la germinación. Sin embargo, pese a que se la ha considerado una vía de germinación diferente a la inducida por nutrientes, se ha observado que puede ser bloqueada por dos compuestos que actúan inhibiendo la germinación con L-alanina y AGFK (Wuytack y col., 2000). Por tanto, no está claro si se trata de una ruta de germinación completamente diferente o, si por el contrario, comparte parte de la ruta de germinación inducida a bajas presiones. En cualquier caso, parece que la germinación a 600MPa no se debería a un mero proceso físico-químico que permitiría la entrada forzosa de agua en el esporo, sino que se podría tratar de una verdadera ruta fisiológica de germinación.

Por otro lado, los esporos germinados a altas presiones (500 - 800 MPa) no generan ATP, ni degradan las proteínas SASPs y mantienen su resistencia a las radiaciones UV y al peróxido de hidrógeno (Wuytack y col., 1998).

Paidhungat y col. (2002) observaron que esporos carentes de los receptores de nutrientes, germinaban de forma rápida a 550 MPa. Sin embargo, la germinación no podía completarse si los esporos carecían también de los enzimas líticos del córtex, pero sí que liberaban el Ca-DPA. Por ello sugirieron que estas presiones abrirían de alguna forma los canales de salida del Ca-DPA.

1.3.5.3. Germinación inducida por dodecilamina

Algunas alquilaminas de cadena larga pueden inducir la germinación a temperaturas inferiores a 70°C (Rode y Foster, 1961). A estas temperaturas, los esporos pueden germinar en presencia de dodecilamina: liberan el Ca-DPA y degradan de forma normal el córtex, sin embargo, a 70°C, el Ca-DPA es liberado, pero el córtex no es hidrolizado, seguramente por la inactivación de los enzimas líticos del córtex (Moir y Cooper, 2015).

Los esporos germinados con este compuesto poseen una menor hidratación y no muestran metabolismo. Además, las proteínas SASPs no son degradadas, aunque los esporos son fácilmente inactivados (Setlow y col., 2003). También se ha demostrado que la germinación con dodecilamina no está relacionada con los receptores de nutrientes, ni con los enzimas líticos del córtex, por lo que parece que se debe a un mecanismo diferente. Es posible que cause cambios en la membrana o que provoque la salida de Ca-DPA (Setlow y col., 2003).

1.3.5.4. Germinación inducida por lisozima

Los esporos constan de una cubierta que los protege de enzimas que degradan el peptidoglicano, como la lisozima. Sin embargo, cuando dicha cubierta es eliminada o dañada, la lisozima puede desencadenar la geminación a través de la degradación del córtex, provocando la salida de Ca-DPA y la hidratación del protoplasto (Moir y Cooper, 2015).

En algunos esporos de *Clostridium*, la presencia de lisozima en el agar favorece su recuperación, ya que reemplaza al sistema de germinación. Se ha visto que la lisozima ayuda a evitar sobreestimaciones de inactivación tras un tratamiento térmico (Peck y col., 1992).

Esto no sucede en esporos de *Bacillus*, ya que la lisozima es capaz de degradar también la pared celular, lo que da lugar a la inactivación del espora.

1.3.5.5. Germinación inducida por fracciones de peptidoglicano

Los esporos también pueden reconocer señales de crecimiento de otras bacterias, como es el caso de fragmentos de peptidoglicano, y desencadenar la germinación (Shah y col., 2008). Durante el crecimiento bacteriano, las bacterias liberan fragmentos de muropéptido de la pared celular, que actúan como potentes germinantes de *B. subtilis* (Shah y col., 2008). Para que se desencadene esta respuesta, es necesaria una kinasa de membrana Serina/Treonina similar a la de eucariotas (PrkC) bien conservada, que contenga un dominio extracelular capaz de unirse al peptidoglicano. Esta kinasa se localiza en la membrana interna de los esporos. Sin embargo, no se conoce cómo funciona la Kinasa PrkC en la germinación, aunque se cree que podría fosforilar algunos

componentes importantes. Además, esta vía de germinación no requiere de receptores de nutrientes y es efectiva en esporos superlatentes (Wei y col., 2010).

Por otro lado, no se ha estudiado esta vía de germinación en muchas especies, por lo que no conocemos el rango completo de esporos que responden a fragmentos de peptidoglicano, aunque se han encontrado homólogos a PrkC en esporos de *Bacillus* y *Clostridium* (Moir y Cooper, 2015).

1.4.Esporos superlatentes

Tradicionalmente se ha definido a los esporos superlatentes como aquellos esporos que no pueden germinar en condiciones que son óptimas para los esporos latentes. Esta población de esporos normalmente no es estática, sino que depende de las condiciones de germinación empleadas. Normalmente se refiere a los esporos superlatentes como aquellos que quedan sin germinar tras un intenso estímulo de germinación (Ghosh y Setlow, 2009). Se cree que la presencia de esporos superlatentes es una estrategia que poseen los esporos para garantizar su supervivencia en ambientes cambiantes.

Sin embargo, en cuanto a la conservación de alimentos, la presencia de esporos superlatentes complica de forma notable el cálculo de los tratamientos necesarios. Se generan desconfianzas en la efectividad de los tratamientos de esterilización, puesto que estos esporos pueden permanecer en estado ametabólico y, por tanto, indetectable, durante largos periodos de tiempo y después germinar y proliferar, causando el deterioro de los alimentos o incluso toxiinfecciones alimentarias. Por otro lado, se ha observado que los esporos superlatentes de *Bacillus* poseen una mayor resistencia térmica que los esporos latentes y un menor contenido de agua en el protoplasto (Ghosh y Setlow, 2009), por lo que podrían ser los responsables de la presencia de fenómenos de cola en las curvas de supervivencia, lo que complica la modelización y predicción del comportamiento de la población.

Se ha observado que la superlatencia no se debe a cambios genéticos, ya que la reesporulación de esporos superlatentes da como resultado características de germinación similares a las de los esporos latentes originales (Chen y col., 2014; Ghosh y Setlow, 2009).

Los esporos superlatentes se pueden clasificar en varios grupos de acuerdo con el estímulo empleado para inducir la germinación: esporos superlatentes a nutrientes (nutrient-SD), esporos superlatentes a Ca^{2+} DPA (Ca^{2+} DPA-SD), esporos superlatentes a dodecilamina (dodecylamine-SD) y esporos superlatentes a altas presiones (HP-SD) (Zhang y Mathys, 2018). Los esporos superlatentes a nutrientes han sido ampliamente estudiados, mientras que a Ca^{2+} DPA y dodecilamina apenas han sido caracterizados y a altas presiones ni siquiera han sido aislados (Zhang y Mathys, 2018).

Es importante destacar que mientras que una fracción de la población puede ser superlatente a un inductor de la germinación, se comporta de forma normal al resto de estímulos, por lo que los mecanismos de superlatencia son diferentes. En cuanto a la superlatencia a nutrientes, que puede suponer entre el 1 y 12 % de la población, se ha sugerido que podría deberse a una baja cantidad de receptores de la germinación (Chen y col., 2014; Ghosh y Setlow, 2009). Por otro lado, la superlatencia a Ca^{2+} DPA, que supone alrededor del 0,9 %, podría deberse a la falta del enzima lítico del córtex CwIJ o a defectos en la cubierta. La superlatencia a la dodecilamina puede suponer el 0,4 % de la población, aunque las causas que lo originan no están claras. Por lo que respecta a esporos superlatentes a altas presiones, a pesar de no haberse aislado hasta la fecha, es de esperar que haya esporos que no respondan a esta tecnología (Zhang y Mathys, 2018). Sin embargo, en cuanto a los tratamientos a presiones de 150 MPa, que inducen la germinación a través de mecanismos relacionados con nutrientes, se ha observado que esporos superlatentes a nutrientes, sí que son capaces de germinar con estas condiciones de presión (Wei y col., 2010).

Por otro lado, se ha observado que los tratamientos térmicos subletales de activación podrían reducir el porcentaje de esporos superlatentes y que los esporos superlatentes requerirían temperaturas de activación de 8 a 15 °C más altas (Ghosh y Setlow, 2009; Ghosh y col., 2009).

Chen y col. (2014) observaron en los esporos superlatentes cambios en la cantidad de algunas proteínas, similares a los que tienen lugar en los esporos latentes durante la germinación. Esto sugiere que, aunque los esporos superlatentes no alcanzan la fase de compromiso (commitment) para germinar, durante la exposición a nutrientes, sí tienen lugar algunos cambios en sus proteínas.

Por último, pese a que hasta ahora tan solo se ha hablado de superlatencia permanente, algunos autores han propuesto también la existencia de una superlatencia transitoria, que desaparecería durante el almacenamiento a 4°C, es decir, que algunos esporos superlatentes mostrarían mayor capacidad para germinar tras un tiempo de almacenamiento (Ghosh y Setlow, 2010).

Dada la importancia que tiene esta fracción de esporos tanto en la conservación de alimentos, como en cuestiones médicas, sería de vital importancia conocer en detalle

tanto las causas que la generan como los mecanismos celulares que tienen lugar en la superlatencia, para poder optimizar los procesos de germinación y posterior inactivación.

1.5. Cuestiones sin resolver

A pesar de que los esporos han sido objeto de estudio desde que se descubrieron, todavía quedan muchas preguntas sin respuesta que, de resolverse, permitirían optimizar los tratamientos de conservación de alimentos. En este apartado se realiza una revisión de las cuestiones relativas a la germinación.

1.5.1. Activación

En primer lugar, aun no se conoce en qué consiste la activación. Sabemos que se puede inducir la germinación por tratamientos como el tratamiento térmico, pero no sabemos que es lo que producen estos tratamientos para poner en disposición de germinar a los esporos. Como se ha comentado, hay varias teorías, entre las que destaca la mayor accesibilidad de los nutrientes a los receptores de la germinación, posiblemente por cambios en las envolturas externas, previsiblemente en la cubierta. Sin embargo, cabe destacar que los procesos de activación han sido estudiados principalmente en especies de esporos que muestran un porcentaje pequeño de superlatencia, como *B. subtilis*, es decir, en poblaciones de esporos en los que normalmente más del 90% son capaces de germinar en ausencia de un tratamiento de activación. Además, en muchas ocasiones para detectar la germinación se utilizan medidas espectrofotométricas, que dan una idea global de la población, pero no dan información a nivel individual.

Por tanto, hay muchas cuestiones sin respuesta cuya resolución podría contribuir a un mayor conocimiento del proceso de activación y, por tanto, a la optimización de los tratamientos de inactivación de los esporos.

1.5.2. Receptores de la germinación (GRs)

Como se ha visto anteriormente, los receptores de la germinación son los receptores con los que interaccionan los nutrientes para desencadenar la germinación. Se ha descrito que la localización de dichos receptores sería la membrana interna del espora, lo que plantea algunas cuestiones: ¿Por qué se localizan en la membrana interna, si los nutrientes se encuentran en el medio extracelular? ¿No sería más fácil si los GRs se encontrasen en alguna envoltura más externa? ¿Cómo atraviesan los nutrientes las envolturas del espora hasta llegar a la membrana interna?

En cuanto a la última pregunta, se ha sugerido que las proteínas GerP podrían jugar algún papel en el transporte de los nutrientes. Se ha visto que la ausencia del operon *gerP* ralentiza la germinación inducida por nutrientes, aunque no la inhibe, por lo que podría haber alguna vía más de entrada de los nutrientes (Carr y col., 2010). Además, al retirar físicamente las envolturas externas del esporo (cubierta y membrana externa) el defecto en la germinación de los esporos $\Delta gerP$ se restablecía, lo que sugiere que estas proteínas participarían en la permeabilización de las envolturas externas del esporo a los nutrientes (Carr y col., 2010).

En cuanto a la localización de los receptores de la germinación en la membrana interna, quizá podría deberse a un mecanismo de protección, ya que de esta manera los receptores estarían protegidos por varias capas.

Por otro lado, tampoco sabemos cómo actúan los receptores de la germinación cuando son activados por los nutrientes. Una posibilidad es que se encarguen de transportar alguna sustancia a través de la membrana, siendo la unión con los nutrientes el desencadenante de la apertura del canal de transporte. Sin embargo, dado que el DPA sería liberado por las proteínas SpoVA, los receptores de la germinación podrían facilitar la salida de cationes monovalentes del protoplasto, o activar las proteínas GerD o SpoVA (Setlow, 2014). En cualquier caso, este mecanismo está lejos de conocerse, por lo que sería necesario investigarlo en profundidad.

1.5.3. Compromiso y periodo de retraso (lag period)

Existe un periodo de tiempo, normalmente corto, entre la adición de los nutrientes y el compromiso del esporo para germinar. A este periodo se le conoce como “lag period” y es diferente para cada esporo a nivel individual. Sin embargo, no se conoce por qué tiene lugar este retraso, aunque se sabe que hay varios factores que condicionan su duración; esta fase es más corta si: i) la concentración de nutrientes es elevada; ii) los esporos tienen gran cantidad de receptores de la germinación; iii) se aplican tratamientos de activación (Setlow, 2014).

En cuanto al compromiso, se trata del momento a partir del cual, aunque se retiren los nutrientes, el esporo continúa con la germinación. Es el primer evento de la germinación y precede a la liberación de Ca-DPA (Yi y Setlow, 2010). Sin embargo, a

pesar de saber que es condicionado por los mismos aspectos que el “lag period”, tampoco se conoce en detalle cómo funciona, ni que es lo que lo conduce a la liberación de Ca-DPA.

El conocimiento en profundidad de estos dos fenómenos nos daría información sobre la heterogeneidad en la germinación de los esporos dentro de una misma población.

1.5.4. Proteínas SpoVA

Las proteínas SpoVA son las responsables de la entrada de DPA en el espora durante la esporulación, y se han encontrado varios fenómenos que sugieren que también son responsables de su liberación durante la germinación. Sin embargo, no sabemos si el canal formado por estas proteínas permitiría también la salida de otros compuestos, como cationes monovalentes. Aunque se ha sugerido que tendría cierta selectividad, pues impide la salida de algunos compuestos como fosfato inorgánico y AMP, entre otros, durante los primeros momentos de la germinación (Setlow y col., 2008). En definitiva, no se sabe qué condiciona la apertura del canal que forman estas proteínas, ni la selectividad a ciertas moléculas. La selectividad podría deberse al tamaño de las moléculas, puesto que los compuestos liberados tienen un peso molecular menor, pero hay que tener en cuenta que algunos compuestos estarían unidos a cationes divalentes.

Por otro lado, tampoco sabemos con certeza cómo se activa el canal de las proteínas SpoVA tras la unión de los nutrientes a los receptores de la germinación. Dicha unión podría inducir de alguna manera la formación del canal, aunque se desconoce a través de qué mecanismo.

1.5.5. Membrana interna

La membrana interna de los esporos posee algunas características diferentes a la membrana citoplasmática de las células vegetativas, o a la membrana de esporos germinados. En los esporos latentes, la membrana se encontraría en un estado semisólido o de gel (Loison y col., 2013), que se perdería tras completarse la germinación. Sin embargo, no sabemos cómo se produce el cambio de estado de la membrana interna de los esporos, ni los efectos que podría tener el estado de esta membrana en la funcionalidad

de los diferentes componentes de la germinación que se encuentran en esta envoltura, como los receptores de la germinación, la proteína GerD o las proteínas SpoVA.

Aunque no tenemos respuesta a la primera pregunta, parece que lo que condicionaría el estado de la membrana interna sería el córtex. Es decir, el córtex podría comprimir la membrana y conferirle de esa forma características semisólidas (Setlow, 2014), aunque es tan solo una teoría, ya que ni el mecanismo, ni la estructura exacta de la membrana se conocen.

1.5.6. Enzimas líticos del córtex

Los enzimas líticos del córtex se encargan de degradar el córtex tras la liberación del Ca-DPA, para permitir la entrada de agua al interior del esporo. Sin embargo, no sabemos qué desencadena la actividad de estos esporos. En *Bacillus*, el enzima CwlJ se ha observado que se activa con el Ca-DPA que se libera del esporo, aunque esto plantea una pregunta: ¿por qué este enzima no se activa durante la entrada de DPA al esporo en la esporulación? Seguramente este sistema dispondrá de algún sistema de regulación, aunque no se conoce.

Por otro lado, en cuanto a la activación del enzima SleB, no está claro cómo funciona, aunque se sabe que no es a través del Ca-DPA. Al igual que en el caso anterior, este enzima se encuentra en el esporo en un estado potencialmente activo. Además, la actividad de ninguno de los dos se inicia por procesos proteolíticos, ya que su peso molecular no varía en la germinación (Setlow, 2014).

Se han encontrado evidencias que sugieren que la proteína YpeB podría inhibir el enzima SleB, aunque no se sabe cómo se produce dicha inhibición.

1.5.7. ¿Es necesaria la síntesis de proteínas para la germinación?

Tradicionalmente había sido aceptado que el metabolismo se iniciaba en la fase de desarrollo, tras la germinación (Paidhungat y Setlow, 2002). Sin embargo Sinai y col. (2015) mostraron evidencias que sugerían la necesidad de síntesis proteica para que tuviera lugar la germinación; observaron, entre otras evidencias, que en presencia de inhibidores de la síntesis proteica, los esporos podían iniciar la germinación, liberando

DPA, pero no podían degradar el córtex. Esta hipótesis fue rechazada por Korza y col. (2016), que observaron que, con tratamientos térmicos entre 75 y 80 °C durante varias horas, que degradaban el 95% del rARN, no se inhibía ni se retrasaba la germinación, lo que sugería que la síntesis de proteínas no era necesaria durante la germinación.

La discrepancia encontrada entre ambos investigadores puede ser debida a la metodología empleada, ya que en un caso es posible que los antibióticos empleados tengan más dianas celulares, lo que podría inhibir la germinación por otro motivo y, en el otro caso, la cantidad que quedaba sin degradar de rARN podría ser suficiente para permitir la síntesis de proteínas.

En cualquier caso, se trata de una cuestión importante que tendría que estudiarse en detalle puesto que su conocimiento podría establecer nuevas dianas celulares que facilitasen la inactivación de los esporos.

1.5.8. Germinación inducida con L-alanina

La L-alanina es uno de los principales nutrientes que desencadenan la germinación mediada por los receptores GerA en *B. subtilis*. Por otro lado, este compuesto forma parte del córtex del espora, suponiendo el 23% de los restos peptídicos en el córtex maduro (Foster y Popham, 2002). Por tanto, el hecho de que un compuesto que forma parte del espora sea un potente germinante, hace plantearse si existe algún mecanismo de germinación en el que la propia L-alanina del córtex sea la que active los receptores de la germinación localizados en la membrana interna del mismo espora.

1.5.9. ¿Cómo se inactivan los esporos?

Como se ha visto en los apartados anteriores, el proceso de germinación de los esporos es muy complejo y requiere de la actividad de numerosos enzimas. Por ejemplo, se ha sugerido que los esporos superlatentes podrían mostrar ese fenotipo como consecuencia de una baja concentración de receptores de la germinación (Chen y col., 2014; Ghosh y Setlow, 2009), lo que les impediría responder a los nutrientes. Por otro lado, también se ha observado que los esporos mutantes que carecen de los enzimas líticos del córtex no son capaces de completar la germinación, quedan bloqueados en la fase I de la germinación (Setlow, 2003). Por tanto, parece lógico preguntarnos si en los

tratamientos habituales de conservación de alimentos los esporos mueren, o si simplemente pierden la capacidad para germinar.

Todavía no podemos contestar a esta pregunta, lo que da una idea del desconocimiento que existe de estos microorganismos, pese a haber sido objeto de estudio desde su descubrimiento a finales del siglo XIX.

1.6. Inactivación de esporos por calor

El calor es la tecnología de conservación de alimentos tradicionalmente más empleada por las industrias agroalimentarias, además se considera el único método de conservación de alimentos, actualmente en uso, capaz de conseguir de forma simultánea estabilidad y seguridad. Es la tecnología de conservación de alimentos más empleada para inactivar los esporos bacterianos.

Los esporos, como es bien sabido, poseen una resistencia térmica muy superior a la de las células vegetativas, llegando a sobrevivir a temperaturas superiores a 100°C durante largos periodos de tiempo (Setlow, 2016). Esta elevada resistencia térmica quizá sea la propiedad que más los defina, es por ello que se ha dedicado mucho esfuerzo a su estudio, tanto de las características que les confieren dicha termorresistencia, como de las cinéticas que definen la inactivación por esta tecnología.

Sin embargo, a pesar de que es bien conocido el efecto que tienen distintos parámetros en la resistencia al calor de los esporos, el mecanismo que conduce a la muerte del espora no se ha establecido.

1.6.1. Mecanismos de inactivación de esporos por calor húmedo y factores fisiológicos que influyen en la termorresistencia

Como se desprende de los apartados anteriores, la formación de esporos representa un sofisticado sistema de resistencia de algunas bacterias. La estructura y componentes tan complejos que poseen les confieren resistencia frente a diversos agentes, tanto físicos como químicos. Además, se ha observado que los esporos pueden poseer varios mecanismos de protección para cada agente, así como un mismo mecanismo que les proteja frente a varios agentes. Quizá sea este el motivo por el que resulta tan complejo establecer las dianas celulares de las diferentes tecnologías de conservación de alimentos, tanto en el caso de los esporos, como en el de las células vegetativas.

La identificación de los eventos celulares que resultan en la muerte de los esporos supondría un gran avance a nivel práctico, ya que permitiría el diseño de tratamientos más eficientes para su inactivación a nivel industrial.

En el caso particular del calor húmedo, pese a que se conocen muchos factores que influyen en la resistencia, el mecanismo exacto por el que los esporos mueren no se conoce.

Parece que la diana celular no sería el **ADN**, al contrario de lo que ocurre con el calor seco, ya que no se ha observado ni daño en esta estructura ni mutagénesis derivada de estos tratamientos (Setlow y Johnson, 2019). Tampoco el estrés oxidativo sería el mecanismo de acción de los tratamientos térmicos, puesto que no se observó daño oxidativo en las proteínas ni se observó efecto protector en condiciones anaerobias, ni empleando sustancias detoxificantes como el etanetiol y el etaneditiol (Setlow y Setlow, 1998). No obstante Setlow y Setlow (1998) tampoco descartan que el mecanismo de acción del calor sea un pequeño daño oxidativo en alguna proteína crucial.

También se ha observado que los tratamientos térmicos causan la **liberación del DPA** (Coleman y col., 2007; Coleman y col., 2010), aunque parece que no estaría relacionado con la muerte, ya que se ha visto que la muerte precede a la liberación de DPA en *B. subtilis* (Coleman y col., 2007), *B. cereus*, *B. megaterium* (Coleman y col., 2010) y *G. stearothermophilus* (Huesca-Espitia y col., 2016). Por tanto, la liberación de DPA sería un fenómeno posterior a la muerte, probablemente debido a la acumulación de daño en la membrana interna.

Se ha sugerido que la **desnaturalización de proteínas** podría ser un evento temprano en la inactivación de esporos por calor, lo que apoyaría la hipótesis de que la inactivación o desnaturalización de algunas proteínas específicas sería el mecanismo principal de la inactivación del espora por calor. Esta es la teoría más aceptada en cuanto al mecanismo de acción de esta tecnología (Coleman y col., 2007; Coleman y Setlow, 2009; Coleman y col., 2010), y se supone que las proteínas involucradas serían proteínas esenciales en alguna ruta metabólica. Sin embargo, no se han identificado dichas proteínas, ni tampoco se sabe cómo la inactivación de estas proteínas desencadena los siguientes eventos que tienen lugar durante la inactivación, como la liberación de Ca-DPA. También se ha sugerido que la liberación de Ca-DPA y otras pequeñas moléculas se debería a una mayor permeabilidad de la membrana interna causada por el tratamiento térmico (Zhang y col., 2011).

Una de las investigaciones que apoya esta teoría se basa en la observación de que poblaciones de esporos sometidas a un tratamiento térmico que suponía entre el 90 y 99%

de inactivación, se separaban en dos bandas de distinta densidad al centrifugarlos por gradientes. Se encontró una banda con esporos más densos, de igual densidad que los esporos latentes, y otra con esporos menos densos, que se correspondían con los que habían liberado el DPA y se habían hidratado. A pesar de que ambas fracciones habían perdido la capacidad para crecer en placa, los esporos que todavía retenían el DPA (fracción más densa) podían germinar en presencia de nutrientes, aunque estarían bloqueados en la fase de desarrollo (Coleman y col., 2007). Los investigadores de este trabajo concluyeron que la muerte de los esporos se produciría por la inactivación de algún enzima esencial de alguna ruta metabólica, necesaria para el desarrollo del esporo una vez germinado. Además, también sugirieron que, de forma posterior a la inactivación, el calor llegaría a producir daños en la membrana interna, lo que daría como resultado la liberación de componentes del protoplasto, como el DPA. Esta teoría ha sido apoyada por otros autores (Coleman y Setlow, 2009; Coleman y col., 2010; Zhang y col., 2009), sin embargo, aún no se ha identificado el o los enzimas afectados por el tratamiento.

También se ha estudiado el papel de las **proteínas de choque térmico** (Heat Shock Proteins) en la resistencia al calor de los esporos, ya que, si la muerte por calor se debe a la desnaturalización de proteínas, es posible que la reparación de dichas proteínas pueda afectar a la termorresistencia de los esporos. Sin embargo, parece que las proteínas de choque térmico no juegan ningún papel importante en la resistencia al calor de los esporos (Melly y Setlow, 2001) y se ha sugerido que la reparación o eliminación de las proteínas dañadas por el calor no sería importante en la supervivencia del esporo, durante su germinación y desarrollo (Melly y Setlow, 2001). Para probar esta hipótesis, Melly y Setlow (2001) estudiaron la expresión de varios genes que codifican proteínas del choque térmico durante la germinación de esporos tratados por calor y observaron tan solo un aumento del 25% en su expresión, lo que les llevó a concluir que los genes estudiados no se inducían por el tratamiento térmico. No obstante, hay que tener en cuenta que estos autores tan solo estudiaron los genes DnaK y GroES utilizando cepas mutantes en un regulador negativo que afecta a dichos genes, pero no emplearon cepas mutantes sin los genes objeto de estudio. Por otro lado, otros investigadores han observado que temperaturas de esporulación por encima de la temperatura óptima de crecimiento se correlacionan con una mayor termorresistencia así como una mayor concentración de chaperonas (proteínas de choque térmico) y proteínas SASPs en los esporos (Checinska

y col., 2015). Por tanto, quizá sean necesarios más estudios para poder conocer realmente si las proteínas de choque térmico participan o no en la resistencia al calor de los esporos.

Por otro lado, se ha observado que los tratamientos térmicos provocan daños subletales en los esporos, que en condiciones de recuperación adecuadas lograrían sobrevivir, pero que en condiciones desfavorables, como en presencia de NaCl o bajos niveles de nutrientes, no podrían llegar a formar colonias (Cazemier y col., 2001; Feeherry y col., 1987; Foegeding y Busta, 1981). Este fenómeno sugiere que en los tratamientos térmicos se produciría la desnaturalización de algunas enzimas y, que este daño podría condicionar la supervivencia posterior del espora, es decir, el espora no sería capaz de germinar y desarrollarse en condiciones desfavorables, pero sí en condiciones favorables de recuperación (Coleman y col., 2007).

En cualquier caso, el mecanismo exacto de la inactivación por calor de los esporos aún no se conoce y serían necesarios más estudios, ya que un mayor conocimiento permitiría optimizar los tratamientos de conservación de alimentos, dañando en menor medida sus propiedades nutricionales y sensoriales.

Por el contrario, sí que se conocen varios factores estructurales y fisiológicos que condicionan la termorresistencia de los esporos.

1. Saturación del ADN con las proteínas SASPs α/β

Al contrario de lo que ocurre en los tratamientos de calor seco, el daño al ADN no es el responsable de la inactivación de los esporos por calor húmedo, aunque a las elevadas temperaturas que resisten los esporos, sería de esperar que aparecieran grandes daños en el DNA, principalmente depurinaciones (Setlow, 2016). Este hecho se debe probablemente a la enorme protección que suponen las proteínas SASPs de tipo α/β que se encuentran saturándolo (Setlow, 2006, 2016), ya que se ha observado que esporos mutantes carentes de dichas proteínas son más sensibles al calor húmedo que las cepas parentales (Setlow y Johnson, 2019).

2. Bajo contenido de agua del protoplasto

Parece que el bajo contenido en agua del protoplasto sería el factor más importante en la resistencia de los esporos al calor. Esta hipótesis estaría basada en que el bajo contenido en agua del protoplasto resultaría en una baja movilidad de las proteínas y, por tanto, una elevada resistencia térmica de las mismas (Setlow, 2016). Se ha comprobado

que la movilidad de las proteínas es extremadamente baja en los esporos latentes (Cowan y col., 2003).

Uno de los mecanismos que poseen para conseguir y mantener este bajo nivel de hidratación es la síntesis del córtex (Setlow, 2016; Setlow y Johnson, 2019). El volumen del córtex se modifica en función de las condiciones de fuerza iónica y pH, por lo que sería capaz de expandirse hacia el protoplasto, comprimiéndolo y desplazando el agua mecánicamente hacia el exterior. A pesar de que este fenómeno no se conoce en detalle, se ha observado una relación directa entre la cantidad de peptidoglicano del córtex y la resistencia al calor y a algunos compuestos químicos, lo que se debería a una menor hidratación del protoplasto (Popham y Bernhards, 2015).

Otro factor que condiciona el contenido en agua del protoplasto es la presencia de Ca-DPA. A pesar de que este compuesto no parece guardar una relación directa con la termorresistencia de los esporos, parece que sí influye indirectamente, modificando el grado de hidratación del protoplasto (Setlow, 2016). Se ha visto que esporos de cepas mutantes, que no son capaces de sintetizar este compuesto durante la esporulación, son más sensibles al calor que las cepas parentales (Setlow, 2006, 2016). Este fenómeno se debería a que los esporos mutantes tendrían un mayor contenido en agua en el protoplasto, ya que el agua ocuparía el lugar normalmente ocupado por Ca-DPA (Setlow y Johnson, 2019).

Sin embargo, pese a que es bien conocida la importancia que tiene el contenido en agua del protoplasto en la resistencia del espora, no se conoce qué cantidad de agua está libre, ni la cantidad precisa de agua asociada a macromoléculas, lo que permitiría calcular el grado de estabilización de las macromoléculas del protoplasto.

3. Mineralización del espora

Otro aspecto importante en la resistencia de los esporos al calor es el grado de mineralización, observándose mayores termorresistencias en esporos con un mayor contenido en minerales (Gerhardt y Marquis, 1989).

Además de grandes niveles de DPA, el protoplasto también contiene grandes niveles de cationes divalentes, la mayoría quelando el DPA. Por tanto, el DPA afectaría a la termorresistencia de forma indirecta también debido a los cationes que lleva asociados (Setlow y Johnson, 2019).

La resistencia térmica de los esporos se ve influida tanto por la concentración como por el tipo de minerales que contienen (Beaman y Gerhardt, 1986; Bender y Marquis, 1985). Se ha observado que esporos desmineralizados, mediante tratamiento ácido, y posteriormente remineralizados, muestran diferentes termorresistencias en función de los cationes empleados en la remineralización. Los cationes que mayor termorresistencia ofrecen son los de calcio, seguidos por manganeso, magnesio, potasio, sodio e hidrógeno (Bender y Marquis, 1985; Gerhardt y Marquis, 1989; Setlow y Johnson, 2019). Sin embargo, a pesar del claro efecto de los minerales en la termorresistencia de los esporos, no se sabe a través de qué mecanismo actúan. Es posible que actúen en parte reduciendo el contenido en agua del protoplasto, aunque podrían tener otra vía de actuación, quizá modulando la resistencia térmica de alguna proteína específica (Setlow y Johnson, 2019).

4. Otros

Berendsen, Boekhorst, y col. (2016) estudiaron el genoma de 18 cepas de *B. subtilis* que mostraban grandes diferencias de termorresistencia: nueve de ellas eran más termosensibles ($D_{100^{\circ}\text{C}}$ de 2,9 min) y las otras nueve más termorresistentes ($D_{100^{\circ}\text{C}}$ de 10,5 horas). Los análisis de genómica mostraron que las cepas más resistentes contenían un elemento genético móvil, un transposon, llamado $\text{SpoVA}^{2\text{mob}}$, que contenía cinco operones, uno de los cuales estaba formado por genes que codifican proteínas homólogas de SpoVAC, SpoVAD y SpoVAEb. Observaron también que, si se eliminaba dicho transposón, el esporo perdía la elevada termorresistencia y que, si este fragmento genético se incluía en el genoma de una cepa sensible, su termorresistencia aumentaba. También se ha encontrado este transposon, con funciones similares, en cepas *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis* (Berendsen, Koning, y col., 2016). Por tanto, parece que la transferencia de genes a nivel horizontal puede afectar profundamente a las características de termorresistencia de los esporos. Sin embargo, no se sabe cómo las proteínas de $\text{SpoVA}^{2\text{mob}}$ modifican la termorresistencia de los esporos, aunque se sabe que estas proteínas enlentecen significativamente la salida de Ca-DPA durante la germinación inducida por diferentes nutrientes.

Otro aspecto que se ha correlacionado con la termorresistencia de los esporos es la **fluidez de la membrana interna**, Minh y col. (2011) observaron que aquellas condiciones en las que se obtenían esporos con una membrana más fluida, como una baja actividad de agua o una baja temperatura de esporulación, daba lugar a esporos con menos

termorresistencia. Por el contrario, condiciones que en las que se obtenía una membrana más rígida, como una baja aireación o temperaturas de esporulación elevadas, daban como resultado esporos más resistentes al calor. Las células pueden regular la fluidez de su membrana alterando la composición lipídica para adaptarse a las condiciones ambientales.

El **estado de maduración de los esporos** también se ha correlacionado con la termorresistencia, parece que la resistencia al calor, así como a otros agentes químicos, se adquiere completamente mucho después de la liberación del espora de la célula madre (Sanchez-Salas y col., 2011). Este fenómeno se cree que puede estar relacionado con cambios en la estructura de la cubierta; por ejemplo, se podrían formar enlaces cruzados en las proteínas de la cubierta (Abhyankar y col., 2015).

1.6.2. Factores medioambientales que condicionan la termorresistencia

La elevada resistencia de los esporos bacterianos a agentes químicos y físicos, como es el caso de los tratamientos térmicos, puede verse afectada por numerosos factores ambientales. Desde un punto de vista práctico resulta fundamental conocerlos para no infravalorar la resistencia en los cálculos de los tratamientos de esterilización.

De forma general podemos asumir que la termorresistencia puede verse modificada por las condiciones de esporulación, las condiciones de tratamiento y las condiciones de recuperación tras el tratamiento térmico.

Condiciones de esporulación

Se ha observado que tanto las características físico-químicas del medio y la temperatura de esporulación (Cazemier y col., 2001), como la exposición a choques térmicos pueden alterar la resistencia de los esporos al calor.

De forma general se asume que todas aquellas condiciones que puedan afectar al contenido en agua del protoplasto podrán modificar las características de termorresistencia de los esporos, ya que se ha descrito como el principal factor en la resistencia al calor de los esporos (Setlow, 2006). Cuando las condiciones de esporulación dan como resultado esporos con un menor contenido de agua en el protoplasto, la

termorresistencia se ve incrementada. Algunas condiciones que aumentan la termorresistencia de los esporos son: elevadas temperaturas de esporulación (Melly y col., 2002; Palop, Manas, y col., 1999; Planchon y col., 2011; Setlow, 2006), elevadas concentraciones de glutamato en el medio (De Vries y col., 2005), pHs ácidos (Baweja y col., 2008) y una elevada actividad de agua en el medio de esporulación (Minh y col., 2008).

- **Temperatura de esporulación**

Se ha visto que temperaturas de esporulación elevadas dan como resultado esporos con una mayor resistencia térmica (Setlow, 2006, 2016). Los esporos de bacterias termófilas, normalmente muestran mayores termorresistencias que los de mesófilas. Además, dentro de la misma especie, los esporos obtenidos a mayor temperatura son más resistentes al calor que los esporulados a menor temperatura. Probablemente la mayor termorresistencia se deba a un menor contenido en agua en el protoplasto ya que las proteínas presentes en los esporos de la misma especie es previsible que sean idénticas a todas las temperaturas de esporulación. Además, las proteínas del espora son normalmente idénticas a las que se encuentran en las células vegetativas, por lo que no es esperable que tengan distinta termorresistencia (Setlow y Johnson, 2019).

Actualmente no se sabe cómo la temperatura de esporulación condiciona el contenido de agua del protoplasto, aunque sí que afecta, además de a la termorresistencia, a la resistencia a algunos agentes químicos. Se ha sugerido que podría deberse a cambios en la estructura del córtex (Melly y col., 2002), puesto que se ha establecido la importancia que tiene esta estructura en la deshidratación del protoplasto (Setlow, 2011). Melly y col. (2002) observaron un pequeño, aunque significativo, aumento en el grado de entrecruzamiento del ácido murámico en los esporos preparados a elevada temperatura; no obstante, no está claro si este fenómeno podría ser el responsable de las diferencias de termorresistencia o si por el contrario la temperatura de esporulación podría cambiar de alguna forma la estructura tridimensional del córtex, o producir algún cambio en la síntesis del córtex durante la esporulación.

También se ha sugerido que el mecanismo a través del cual la mayor temperatura de esporulación confiere resistencia frente al calor podría estar relacionado con una mayor mineralización en los esporos obtenidos a temperaturas elevadas (Palop, Sala, y col., 1999).

- **Esporulación en medio líquido o sólido**

También se ha descrito que el estado del medio de esporulación influye en la termorresistencia, siendo los esporos obtenidos en medio sólido más resistentes que los obtenidos en medio líquido (Rose y col., 2007). Aunque no se observaron diferencias en cuanto a contenido en agua, DPA y proteínas SASPs, sí que se encontraron pequeñas diferencias en la cubierta y en el perfil de los ácidos grasos de la membrana interna. Sin embargo, no hay evidencias de que estos cambios tengan repercusión en la termorresistencia de los esporos, por lo que podría haber otras diferencias que justificaran este cambio.

- **Choque térmico**

Los tratamientos térmicos subletales al inicio de la esporulación dan como resultado esporos más termorresistentes (Melly y Setlow, 2001; Movahedi y Waites, 2000; Wells-Bennik y col., 2016). Se ha visto que estos tratamientos inducen la sobreexpresión de las proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins), aunque desaparecen más tarde en la esporulación, lo que sugiere que estas proteínas no serían las responsables del aumento de resistencia térmica de los esporos pretratados térmicamente (Melly y Setlow, 2001). Por otro lado, el contenido de agua de los esporos obtenidos tras un choque térmico es similar al de esporos obtenidos en condiciones normales (Melly y Setlow, 2001), por lo que el mecanismo sería diferente al sugerido para el efecto de la temperatura de esporulación.

También se ha observado que los choques térmicos durante la esporulación producen un aumento en la concentración de cationes divalentes, como Ca(II), Mn (II) y Mg(II) en los esporos, que está relacionada con una mayor termorresistencia en *G. stearothermophilus* (Sang-Wook y Sang Jun, 2006). Esta mayor resistencia térmica, tanto al color húmedo como seco, debida a un mayor contenido en Mn(II) también ha sido descrita en esporos de *B. megaterium* sometidos a un choque térmico (Ghosh y col., 2011).

En definitiva, no se conoce a través de qué mecanismo los choques térmicos aumentan la termorresistencia, aunque los datos publicados sugieren que los choques podrían alterar la estructura del espora en lugar de influir en la reparación del daño térmico durante su germinación y desarrollo (Movahedi y Waites, 2000).

- Composición del medio de esporulación

La composición del medio de esporulación juega un papel importante en la resistencia frente al calor de los esporos. Se ha observado que grandes cantidades de Mn^{2+} en el medio de esporulación confieren mayor termorresistencia a los esporos (Ghosh y col., 2011). Cazemier y col. (2001) observaron que esporos de diferentes especies de *Bacillus* obtenidos en agar nutritivo con Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} y K^+ eran más termorresistentes que esporos obtenidos en medio nutritivo solo con Mn^{2+} , posiblemente debido a que el contenido en agua era menor.

Es posible que al modificar la composición del medio de esporulación se pueda modificar la composición del protoplasto del espora; por ejemplo, si se retirase del medio de esporulación el Ca^{2+} no se podría formar el complejo Ca-DPA y los esporos resultantes serían más sensibles al calor (Minh y col., 2011). Sin embargo, se ha descrito que la presencia de cationes divalentes en el medio de esporulación no afecta a la termorresistencia de *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Yamazaki y col., 1997).

Condiciones del medio de tratamiento

Las condiciones del medio de tratamiento pueden condicionar en gran medida la resistencia térmica de los esporos, de forma que esporos obtenidos en las mismas condiciones, podrían mostrar termorresistencias muy diferentes en función de las características del medio de tratamiento.

El **pH** es uno de los principales factores que condiciona la resistencia al calor. De hecho, los alimentos se dividen en ácidos ($pH < 4,5$) y poco ácidos ($pH > 4,5$) para determinar la severidad del tratamiento a aplicar. En términos generales se asume que pHs óptimos de crecimiento, que normalmente son próximos a la neutralidad, suponen mayor termorresistencia y que dicha termorresistencia disminuye cuando el pH aumenta o disminuye del valor óptimo (Jay, 1992). También se ha observado que el tipo de ácido orgánico tiene diferentes efectos en la resistencia térmica de *B. subtilis* (Leguérinel y Mafart, 2001). Sin embargo, el mecanismo por el que el pH modifica la termorresistencia no está claro. Gould y Dring (1975) propusieron que el tratamiento en medio ácido podría causar una protonización de los grupos carboxilos del peptidoglicano del córtex, lo que daría lugar al colapso de la estructura y a la hidratación del protoplasto.

La actividad de agua del medio en el que se tratan los esporos también condiciona la termorresistencia. Se ha observado una mayor termorresistencia en medios de tratamiento con actividades de agua entre 0,2 y 0,4 (Murrell y Scott, 1966). Además el soluto empleado para reducir la actividad de agua también influye en la resistencia al calor de los esporos; Coroller y col. (2001) observaron que la sacarosa protegía más frente al calor a *B. cereus* que la glucosa o el glicerol. Sin embargo, pese a que el mecanismo por el que la actividad de agua ejerce un papel protector no se conoce con claridad, parece que se ha relacionado con una mayor estabilización de las proteínas y componentes celulares (Corry, 1974; Syamaladevi y col., 2016), ya que este efecto protector también se ha observado en enzimas purificadas (Makki y Durance, 1996).

Otro aspecto importante es la composición del medio de tratamiento, ya que algunos componentes actúan como protectores frente al calor. Molin y Snygg (1967) observaron que la grasa del medio de tratamiento tenía un efecto protector en *B. cereus*, que podía deberse a una menor actividad de agua del medio de tratamiento. Stoeckel y col. (2013) observaron que los esporos eran más termorresistentes cuando las fórmulas infantiles estaban concentradas, probablemente también debido a una menor actividad de agua.

Condiciones de recuperación tras el tratamiento térmico

Las condiciones de recuperación tras el tratamiento influyen de forma notoria en la resistencia al calor de los esporos, ya que la inactivación por calor no es un proceso de todo o nada, sino que se producen daños subletales que, en condiciones adecuadas de recuperación, serán reparados y permitirán el crecimiento de la célula. Por el contrario, cuando las condiciones de recuperación no sean adecuadas, la célula no será capaz de reparar los daños y morirá.

La composición del medio de recuperación juega un papel clave en la reparación de los esporos tras el tratamiento. Se ha descrito que, en presencia de sal, así como de otros agentes inhibidores como los antibióticos o los ácidos orgánicos, los esporos muestran una menor termorresistencia aparente (Briggs y Yazdany, 1970; Cazemier y col., 2001; Cook y Gilbert, 1969; Periago y col., 1998). Este fenómeno se ha relacionado con la presencia de daños subletales en las membranas celulares de los esporos (Adams, 1978; Mackey, 2000). Cazemier y col. (2001) observaron que cuando el medio de

recuperación contenía, además de sal, prolina y KCl, se disminuía el efecto inhibitorio de la sal en *B. subtilis*, por lo que sugirieron que los tratamientos térmicos podrían dañar las proteínas osmoreguladoras o las proteínas implicadas en la síntesis de prolina. Se sabe que *B. subtilis* posee un sistema de captación de K^+ , sensible a la turgencia de la célula, que desencadena la síntesis de prolina como soluto compatible.

Por otro lado, algunas sustancias como el almidón o el carbón activo parece que favorecen la recuperación de esporos de *G. stearothermophilus* tratados por calor (Cook y Gilbert, 1968); es posible que estas sustancias actúen absorbiendo algunos tóxicos presentes en el medio que impiden la germinación de los esporos (Cook y Gilbert, 1968).

La actividad de agua del medio de recuperación también influye en la termorresistencia de los esporos, siendo menor conforme desciende esta (Coroller y col., 2001). Además, se ha visto que el efecto inhibitorio de la reducción en la actividad de agua durante la recuperación, compensa el efecto protector durante el tratamiento (Coroller y col., 2001).

La presencia de Ca-DPA en el medio de recuperación podría favorecer la recuperación de esporos en los que se hubieran dañado los receptores de la germinación. Cazemier y col. (2001) observaron que *B. subtilis* mostraba una pequeña mejora en la recuperación en estas condiciones. Sin embargo, otros autores no han observado este fenómeno (Coleman y col., 2007).

Además, en *Clostridium* se ha visto que la presencia de lisozima en el medio de recuperación podría favorecer su recuperación (Fernández y Peck, 1999; Peck, 2010), ya que este compuesto podría hidrolizar el córtex del esporo, permitiendo así la germinación. Parece que las enzimas líticas del córtex de los esporos de *Clostridium* se dañan subletalmente durante los tratamientos térmicos y que, en presencia de lisozima, son capaces de germinar y multiplicarse (Peck y Stringer, 2005).

Otro parámetro importante en la recuperación celular es la temperatura de incubación, y se ha descrito que los esporos tratados térmicamente se recuperan mejor a temperaturas inferiores a las óptimas de crecimiento (Adams, 1978; Condón y col., 1996; López y col., 1997). Este fenómeno se ha relacionado con la etapa de desarrollo, que sería más sensible a la temperatura que la etapa de germinación (Prentice y Clegg, 1974). A menores temperaturas el desarrollo es más lento y permite reparar los daños que se hayan podido originar en la célula (Mackey, 2000). Por otro lado, también se ha propuesto que

la temperatura de recuperación podría afectar a la germinación, activando e inactivando distintos sistemas de germinación con diferentes temperaturas óptimas (Mackey, 2000). Por otro lado, Katsui y col. (1982) observaron que, al reducir la temperatura de incubación se producía un aumento de la proporción de ácidos grasos insaturados en las células y, por tanto, se modificaba la fluidez de la membrana. Esta observación sugería que los procesos de reparación tras un tratamiento térmico podrían estar condicionados por la fluidez de los lípidos de la membrana.

1.6.3. Cinética de inactivación de los esporos por calor

Como en cualquier tecnología de conservación de alimentos, en los tratamientos térmicos es necesario conocer las cinéticas de inactivación de los microorganismos con el fin de optimizar las condiciones de calentamiento, así como conocer los aspectos de fisiología celular que la justifican. La cinética de inactivación por calor depende del microorganismo estudiado y de las condiciones de tratamiento: temperatura, tiempo y características del medio de tratamiento.

En los últimos años se ha avanzado mucho en el desarrollo de ecuaciones matemáticas y/o modelos predictivos que permitan describir el comportamiento microbiano, tanto en el crecimiento como en la inactivación por diferentes agentes. La microbiología predictiva permite comparar la letalidad entre tratamientos y determinar el impacto de diferentes factores en la inactivación y el crecimiento microbiano, por lo que hoy en día se considera una herramienta muy útil para conocer el impacto microbiológico durante el procesado y distribución de los alimentos.

Existen varios tipos de modelos matemáticos y varias clasificaciones; en función del fundamento matemático se dividen en modelos empíricos, que se ajustan a los datos obtenidos experimentalmente, pero que carecen de significado fisiológico y los modelos mecanicistas, que parten de una base biológica teórica. También se pueden clasificar en función de las bases matemáticas utilizadas para su obtención, en modelos cinéticos y probabilísticos.

Fueron Bigelow (1921) y Esty y Meyer (1922) quienes empezaron a estudiar la cinética de inactivación de esporos bacterianos por calor, observando que la inactivación por calor podía definirse matemáticamente, ya que seguía una cinética de primer orden.

Esta cinética de inactivación implica que a iguales intervalos de tiempo se inactiva una proporción igual de la población. Al representar el logaritmo del número de supervivientes en función del tiempo de tratamiento se observa una gráfica lineal conocida como gráfica de supervivencia (Figura 1.12). A partir de esta gráfica podemos obtener el valor D_t (tiempo de reducción decimal), que se define como el tiempo en minutos, a una determinada temperatura, que es necesario tratar la población microbiana para reducir su recuento un ciclo logarítmico. Este valor se corresponde con el inverso negativo de la pendiente de la gráfica de supervivencia.

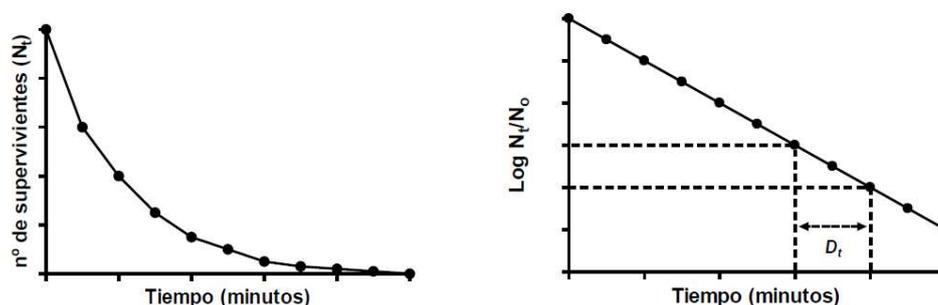


Figura 1.12. Efecto del tiempo de tratamiento en la supervivencia microbiana al calor (gráfica de supervivencia).

Asumiendo que la inactivación microbiana sigue una cinética de primer orden, no es posible conseguir la esterilidad absoluta pues el tiempo de tratamiento debería ser infinito, motivo por el que siempre existirá un riesgo de supervivencia. Además, la probabilidad de supervivencia dependerá de las características intrínsecas de la población microbiana, del tiempo de tratamiento y de la concentración microbiana inicial.

Conociendo el parámetro D_t y la concentración inicial de microorganismos, y asumiendo un determinado nivel de riesgo, podemos calcular el tiempo de tratamiento a una determinada temperatura. Además, al representar el logaritmo de D_t en función de la temperatura obtenemos la gráfica de termodestrucción (Figura 1.13). A partir de esta recta podemos calcular el valor z , que se define como el número de grados que hay que aumentar la temperatura de tratamiento para reducir el valor D_t a la décima parte y que se corresponde con el inverso negativo de la pendiente.

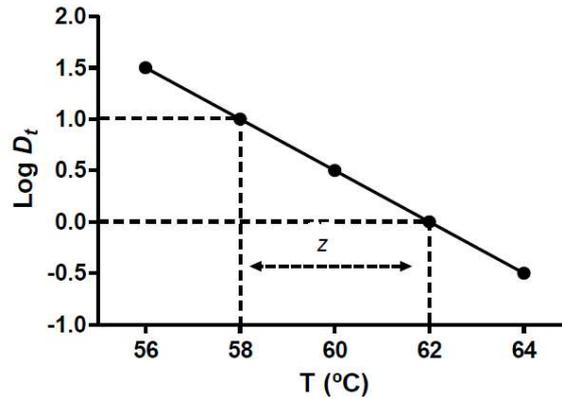


Figura 1.13. Cálculo del valor z a partir de la representación gráfica de la relación existente entre los valores D_t y la temperatura para un microorganismo hipotético.

Sin embargo, pese a que frecuentemente las gráficas de supervivencia de los esporos por calor siguen un curso lineal, a menudo aparecen desviaciones en la linealidad. Estas desviaciones pueden aparecer en forma de “hombro”, debido a retrasos en el comienzo de la inactivación, y “cola”, debido a retrasos en la inactivación al final de las gráficas de supervivencia. También pueden aparecer ambos fenómenos simultáneamente, dando lugar a gráficas con perfiles sigmoideos.

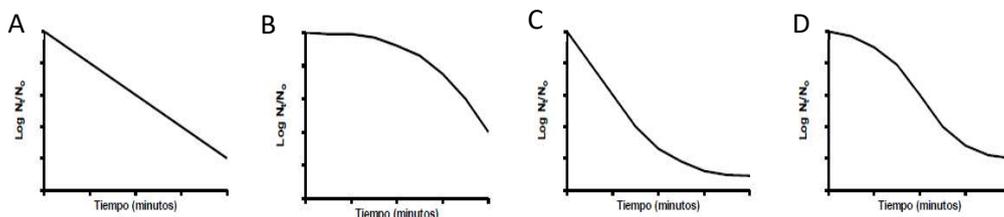


Figura 1.14. Desviaciones de la linealidad en las gráficas de supervivencia observadas en los tratamientos térmicos. A: Perfil recto: Cinética lineal. B: Perfil convexo debido a la presencia de fenómenos de hombro. C: Perfil cóncavo debido a la presencia de fenómenos de cola. D: Perfil sigmoideo debido a la presencia de fenómenos de hombro y cola.

Los **fenómenos de hombro** son desviaciones del orden logarítmico de inactivación muy frecuentes, en los que, durante los primeros momentos del tratamiento, el recuento no disminuye, o incluso puede observarse un incremento en el número de supervivientes. Hay varias teorías sobre la causa de su aparición; algunos autores los han

achacado a artefactos metodológicos, como por ejemplo debido al empleo de métodos de calentamiento con una baja transferencia de calor, en los que la fase de calentamiento anisotérmico inicial es la responsable del retraso en el comienzo de la inactivación. Por otro lado, otros autores han atribuido la presencia de hombros a aspectos fisiológicos o incluso a procesos de agregación celular.

En el caso particular de los esporos, los fenómenos de hombro pueden estar también relacionados con la activación de esporos superlatentes, por lo que el recuento puede aumentar al principio del tratamiento. De darse este fenómeno, durante el calentamiento se producirían dos procesos simultáneamente, la activación de esporos superlatentes, que tendería a aumentar el recuento, y la inactivación de esporos latentes, que tendería a disminuirlo. Del equilibrio de ambos fenómenos dependerá la existencia y perfil del hombro (Corradini y col., 2010).

Por otro lado, los hombros también se han relacionado con la acumulación de daños en los esporos, insuficientes por si solos para provocar la muerte. En el caso de que las células sean capaces de reparar dichos daños, el recuento no se verá reducido y aparecerá un hombro al inicio del tratamiento. En el momento en el que los daños causados superen la capacidad de reparación de la célula, se producirá la inactivación (Condón y col., 1996).

Los esporos dañados subletalmente muestran mayor tiempo de germinación, alteraciones nutricionales, diferentes temperaturas óptimas de recuperación, mayor recuperación en presencia de almidón o carbón activo, mayor influencia de la atmósfera o el potencial redox y sensibilidad al cloruro sódico así como a otros conservantes y antibióticos (Mackey, 2000). Por tanto, la letalidad del tratamiento está condicionada por las condiciones de recuperación posterior, si estas son adecuadas habrá más esporos capaces de sobrevivir al tratamiento.

Cabe destacar que los esporos pueden ser dañados subletalmente tanto en el sistema de germinación, como en la maquinaria celular relacionada con el desarrollo y la multiplicación, lo que incluye componentes genéticos, metabólicos y estructurales diferentes a los de una célula vegetativa.

Por otro lado, los fenómenos de cola se manifiestan en las porciones finales de la gráfica de supervivencia donde disminuye o incluso se detiene el ritmo de inactivación. Para justificar la presencia de este fenómeno de cola, Cerf (1977) clasificó las teorías existentes en dos grupos: teorías vitalistas y teorías mecanicistas.

- Las teorías vitalistas defienden la presencia de una distribución heterogénea de resistencias dentro de la población. Al inicio del tratamiento, se inactivaría la fracción menos resistente, que habitualmente es la más numerosa. Posteriormente, la pendiente de la gráfica de supervivencia disminuiría debido a la mayor termorresistencia del resto de la población.
- Las teorías mecanicistas, por otro lado, asumen que los individuos de una misma población tienen una resistencia similar y que la cinética de inactivación sigue una cinética exponencial. Estas teorías relacionan la presencia de colas con anomalías de carácter metodológico, a adaptaciones de las células al calor o a la presencia de agregados celulares, entre otros.

1.6.4. Modelización de las gráficas de supervivencia

Dado que la presencia de desviaciones en la linealidad de las gráficas de supervivencia es un fenómeno habitual, algunos autores han cuestionado la validez del modelo tradicional para describir las cinéticas de inactivación por calor (Peleg, 2006). Es por ello que se han propuesto numerosos modelos matemáticos para calcular y ajustar con fiabilidad los actuales tratamientos térmicos, sustituyendo el modelo exponencial tradicional, como son el modelo de Weibull, que asume la presencia de diferentes resistencias a los tratamientos de las células individuales, o el modelo de Gompertz modificado. Este último, sin base biológica y, a pesar de que su aplicación inicial fue la descripción de curvas de crecimiento, puede resultar útil para modelizar las curvas de supervivencia cambiando el signo de la ecuación.

Uno de los modelos más utilizados es el modelo de Geeraerd (Geeraerd y col., 2000; Geeraerd y col., 2005). Este modelo tiene una base biológica, aunque muy genérica, y permite describir el comportamiento celular cuando en las gráficas de supervivencia aparecen fenómenos de hombro y/o cola. Además, también permite cuantificar la magnitud de dichos fenómenos. Este modelo describe la cinética de inactivación en función de la tasa de inactivación, la duración del hombro y el recuento al que aparece la

cola, lo que permite la interpretación a través de fenómenos fisiológicos celulares. Además, se asume que la parte central de la gráfica sigue un ritmo de inactivación exponencial, por lo que no contradice la teoría clásica de Bigelow y Esty.

El modelo de Geeraerd se define por la siguiente ecuación:

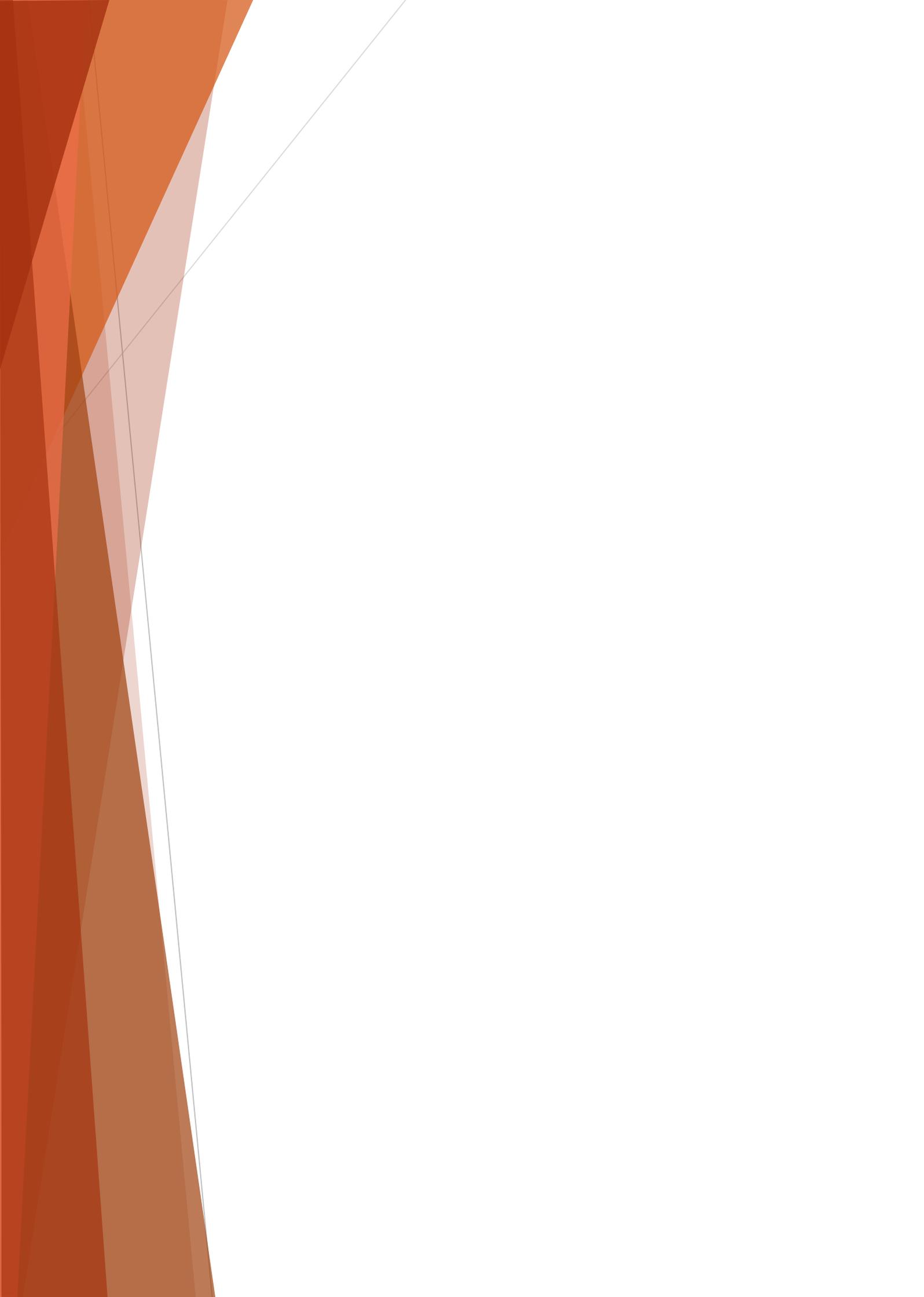
$$N(t) = (N(0) - N_{res}) \cdot e^{-K_{max} \cdot t} \cdot \left[\frac{e^{K_{max} \cdot Sl}}{1 + (e^{K_{max} \cdot Sl} - 1) \cdot e^{-K_{max} \cdot t}} \right] + N_{res}$$

Donde:

- $N(t)$ representa la concentración de células en el tiempo “t” (UFC/ml)
- $N(0)$ es la concentración inicial de células (UFC/ml)
- N_{res} representa la concentración de células residuales (la cola de la gráfica de supervivencia) (UFC/ml)
- K_{max} es la velocidad de inactivación (1/unidad de tiempo)
- Sl es la duración del hombro (unidad de tiempo)
- t es el tiempo de tratamiento (unidad de tiempo)

Este modelo no tiene en cuenta la posible presencia de fenómenos de hombro en los que el recuento al inicio del tratamiento aumenta como consecuencia de la activación de esporos superlatentes. Para poder describir este tipo de gráficas de supervivencia se han desarrollado varios modelos matemáticos con distintas particularidades y enfoques (modelo de Rodriguez y col. (1991), modelo de Sapru y col. (1992), modelo de Iciek y col. (2000)), que serán descritos y discutidos en el capítulo 4.3 de Resultados de esta Tesis Doctoral.

2. Justificación y objetivos



Debido a la globalización del mercado la industria alimentaria necesita producir alimentos con una vida útil más prolongada y que conserven todas sus propiedades. No obstante, la presencia de esporos en los alimentos complica este objetivo debido a la escasa eficacia bactericida que poseen las tecnologías de conservación de alimentos sobre estos microorganismos, tanto las tecnologías tradicionales como las nuevas tecnologías. Por lo que respecta a las nuevas tecnologías, aunque no consigan destruir esporos a los niveles requeridos, podrían producir cambios en las estructuras celulares que una vez conocidos y controlados podrían utilizarse para establecer nuevas dianas celulares y desarrollar nuevas estrategias para la conservación de alimentos con tecnologías no térmicas, o con procesos combinados. Por otro lado, los tratamientos térmicos intensos, capaces de inactivar esporos, producen pérdidas nutricionales y alteraciones sensoriales en los alimentos. Por tanto, ampliar el conocimiento en la inactivación por calor de los esporos podría ayudar a optimizar los tratamientos necesarios para inactivarlos hasta niveles aceptables, sin sobretratar los alimentos.

La esterilización de los alimentos por el calor fue el primer procedimiento de conservación de los alimentos que de ser un arte se transformó en un proceso científicamente controlado. El cálculo de los tratamientos térmicos fue también el origen de la modelización predictiva en el sector alimentario. Pese a la antigüedad del proceso, sabemos hoy con certeza que en ocasiones la cinética de inactivación, utilizada habitualmente para el cálculo de los tratamientos, no es cierta y que los modelos utilizados deberían mejorarse.

Hemos avanzado mucho en el conocimiento de la fisiología y estructura de los esporos bacterianos, pero también en este aspecto existen enormes lagunas de conocimiento, que se han comentado en la introducción. A modo de ejemplo baste decir que todavía hoy no podríamos definir lo que es la activación, no sabemos la causa de la aparición de los esporos superlatentes, ni cuales son sus diferencias con los esporos latentes; de hecho, ni siquiera sabemos si al aplicar un tratamiento térmico activamos a los esporos como paso previo a su destrucción. Nuestro conocimiento de la germinación es también muy limitado; de hecho, ni siquiera sabemos si al aplicar los tratamientos tecnológicos destruimos al espora o tan solo alteramos sus mecanismos de germinación.

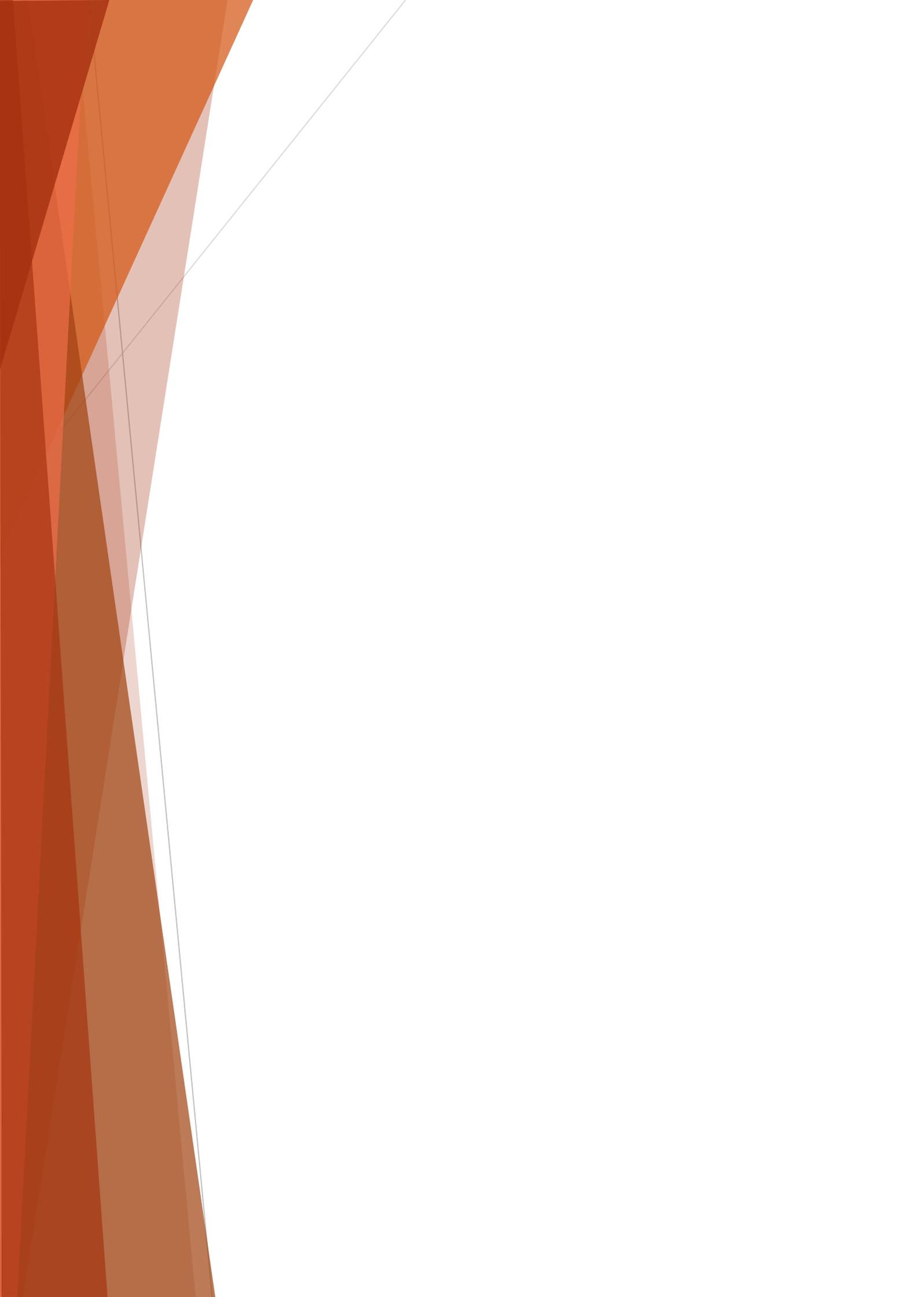
Nuestro grupo de investigación tenía amplia experiencia de trabajo con esporos bacterianos hace años, pero esta línea de trabajo se redujo drásticamente al focalizar nuestros esfuerzos en el estudio de las tecnologías no térmicas de conservación. Durante

estos años se han producido espectaculares mejoras de las técnicas de biología molecular y nuestro grupo ha crecido notablemente, lo que nos ha estimulado a relanzar esta línea, en cuyo marco se encuadra esta tesis doctoral.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue ampliar el conocimiento en la activación, germinación e inactivación de esporos bacterianos, lo que permitirá diseñar tratamientos de conservación de alimentos más eficaces frente a estos microorganismos, dañando en menor medida las propiedades de los alimentos. Para ello, se utilizarán distintos géneros y especies de bacterias esporuladas, que incluirán a *B. subtilis*, como especie modelo más estudiada en la literatura científica, y a *G. stearothermophilus*, capaz de formar un porcentaje elevado de esporos superlatentes, pero también se usarán, cuando se considere oportuno, otras bacterias esporuladas como *B. cereus*, *B. licheniformis* o *B. weihenstephanensis*. Los objetivos parciales que se plantearon fueron:

- Estudiar las cinéticas de inactivación por calor de varias especies esporuladas con el objetivo de mejorar en lo posible el cálculo de los tratamientos.
- Estudiar el efecto de distintas tecnologías en la activación de los esporos, tanto en su vertiente cinética como fisiológica. Para conseguir este objetivo será necesario optimizar la esporulación de una especie adecuada para conseguir suspensiones de trabajo con, al menos, un 90% de esporos superlatentes.
- Estudiar el efecto de distintas tecnologías en la germinación de esporos de *B. subtilis* -especie de referencia- obtenidos en distintas condiciones, así como los cambios fisiológicos que se producen durante la germinación. Para ello será necesario poner a punto técnicas de fluorimetría y de microscopía, tales como la metodología para detectar la permeabilidad de la membrana interna y del córtex.

3. Material y métodos



3.1. Microorganismos y medios de cultivo y recuperación

Los microorganismos empleados en esta tesis doctoral fueron: *Geobacillus stearothermophilus* CECT 4517 (suministrado por Zeulab), *Bacillus subtilis* CECT 461, *Brevibacillus choshinensis*, *B. cereus* CECT 148, *B. subtilis* CECT 4524 *B. licheniformis* CECT 4523, *G. stearothermophilus* CECT 4517 y *B. weihenstephanensis* (suministrado por el grupo del Profesor Lyng: “School of Agriculture and Food Science, University College Dublin).

Todos los microorganismos se conservaron en crioviales a -80 °C, a partir de los cuales se hacía una estría en agar nutritivo con 0,6 % de extracto de levadura (ANYE) (Oxoid, Madrid, España). De la estría se pasaba una colonia a precultivo de caldo nutritivo con 0,6 % de extracto de levadura (CNYE) (Oxoid) y posteriormente a cultivo (CNYE) (Oxoid). A partir del cultivo, se inoculaba un matraz con el medio de esporulación adecuado para cada microorganismo. Las condiciones de esporulación de cada microorganismo se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Condiciones de esporulación de los diferentes microorganismos.

Microorganismo	Origen	Medio esporulación	Temperatura esporulación
<i>G. stearothermophilus</i>	Zeu (Zaragoza, España)	Medio específico capítulo 1 resultados	55 °C
<i>G. stearothermophilus</i> CECT 4517	CECT	CNYE + MnSO ₄ (3 ppm) (Oxoid)	55 °C, 45 °C y 65 °C
<i>B. subtilis</i> 168	CECT	2xSG (Leighton y Doi, 1971)	30 °C
<i>B. choshinensis</i>	B. Braun Medical, S.A	Caldo nutritivo con extracto levadura (CNYE) (0.6%) + MnSO ₄ (3 ppm) (Oxoid)	30 °C
<i>B. cereus</i> CECT 148	CECT	CNYE + MnSO ₄ (3 ppm) (Oxoid)	30 °C
<i>B. subtilis</i> CECT 4522	CECT	CNYE + MnSO ₄ (3 ppm) (Oxoid)	30 °C
<i>B. licheniformis</i> CECT 4523	CECT	CNYE + MnSO ₄ (3 ppm) (Oxoid)	37 °C
<i>B. weihenstephanensis</i>	University College Dublin	CNYE + MnSO ₄ (3 ppm) (Oxoid)	25 °C

Las esporulaciones se iban siguiendo en el tiempo a través de observación microscópica y se recogían cuando el porcentaje de esporos se mantenía constante.

Adicionalmente, en los estudios de optimización de la esporulación de *G. stearothermophilus*, se hacían recuentos antes y después de una pasterización (75 °C/30 min) para conocer el porcentaje exacto de esporulación. Una vez recogidos se centrifugaban (4000 r.p.m. durante 20 min a 4 °C) (Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau, Alemania) y se resuspendían, de forma general, en agua destilada estéril, aunque ocasionalmente, donde lo especifique, se recogieron en tampón McIlvaine pH 7. Los esporos de *G. stearothermophilus* empleados en los estudios de activación se sometían también a una agitación con perlas de vidrio posterior, en refrigeración durante una semana, para inactivar las posibles células vegetativas que quedasen sin germinar y para disgregar los posibles agregados de esporos que pudiese haber en la suspensión.

Adicionalmente, se hacían también recuentos microscópicos en cámara de Thoma. Para ello se colocaba un portaobjetos en la cámara y posteriormente se introducía la suspensión a contar, por capilaridad. Una vez preparada la muestra, se procedía al recuento en el microscopio que consistía en contar los esporos presentes en un volumen determinado de muestra, utilizando para ello el contraste de fases. Posteriormente se multiplicaba el resultado por el factor de corrección correspondiente a la cámara de recuento, obteniéndose la concentración de esporos en esporos/ml.

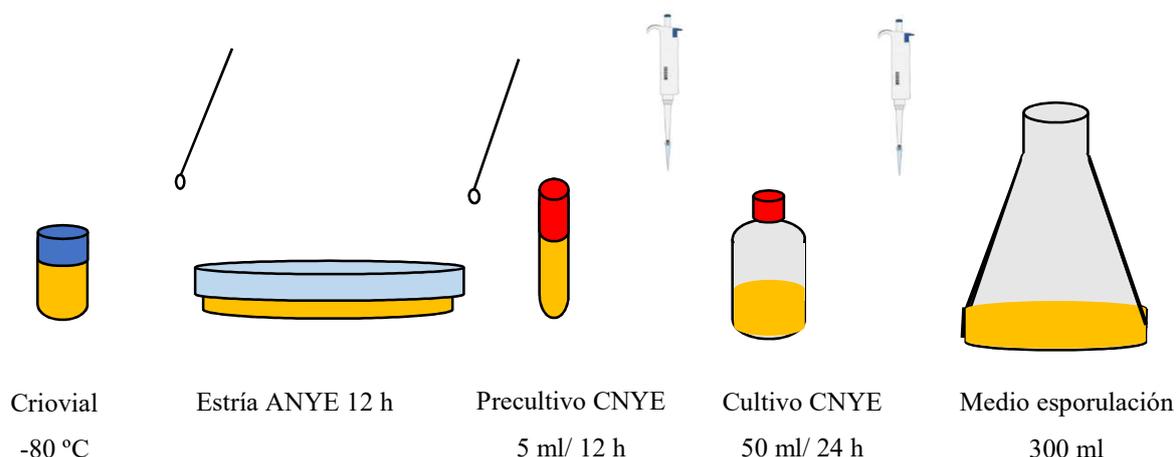


Figura 3.1. Esquema del proceso de obtención de una suspensión de esporos.

Para la recuperación tras los tratamientos, los esporos se sembraban en placas Petri de agar nutritivo con extracto de levadura (ANYE) (Oxoid) por homogenización en masa

y se incubaban a la temperatura óptima para cada microorganismo: 25 °C para *B. weihenstephanensis*, 30 °C para *B. cereus*, 37 °C para *B. subtilis* y *B. licheniformis* y 55 °C para *G. stearothermophilus*. El tiempo de incubación fue de 24 horas en todos los casos, salvo para *G. stearothermophilus*, que fue de 48 horas.

3.2. Tratamientos térmicos

Las determinaciones de resistencia al calor se realizaron mediante cuatro procedimientos diferentes. Por un lado se utilizó un termorresistómetro (Condón y col., 1993) modificado (Equipo Mastía, Universidad Politécnica de Cartagena) (Conesa y col., 2009). Este equipo consta de una cámara de tratamiento (400 ml) donde se introduce el medio en el que se aplican los tratamientos térmicos; una resistencia que calienta el medio hasta la temperatura deseada; un sistema de refrigeración; un sistema de agitación que asegura una correcta homogenización; una entrada de presión regulada con un manorreductor, que permite trabajar a temperaturas superiores a la de ebullición del agua a presión atmosférica; una sonda de temperatura con la que se regula la temperatura de trabajo; un sistema de extracción de muestras, para poder sacar muestras a lo largo del tratamiento y un sistema de inyección del inóculo con el que se desea trabajar (Figura 3.2).

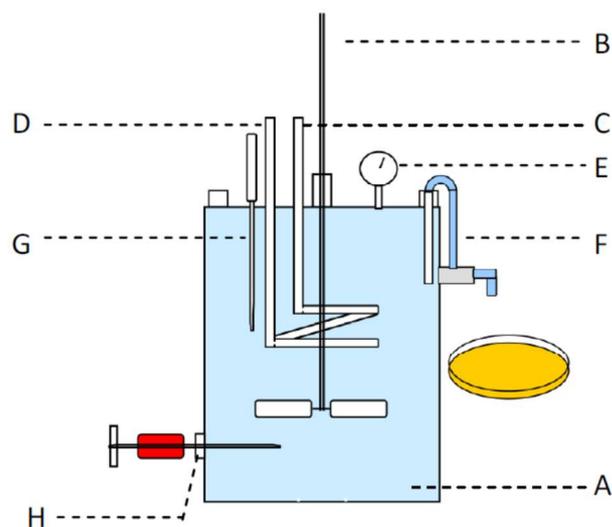


Figura 3.2. Esquema del termorresistómetro: (A) Cámara de tratamiento; (B) Eje de agitación; (C) Resistencia eléctrica; (D) Circuito de refrigeración; (E) Entrada de presión; (F) Sistema de toma de muestras; (G) Sonda termopar; (H) Puerto para inocular. Figura obtenida de Marcén y col. (2017).

Antes de realizar los tratamientos, el equipo, junto con el medio de tratamiento, se esterilizaba a 121 °C durante 20 minutos y posteriormente se seleccionaba la temperatura de tratamiento. Una vez se mantenía constante la temperatura, se inoculaba 0,1 ml de la suspensión microbiana (en ocasiones era necesario realizar diluciones previas). A lo largo del tratamiento se iban extrayendo muestras, que se recogían y enfriaban en tubos Eppendorf sumergidos en agua a temperatura ambiente. Posteriormente, se sembraban 0,1 ml en placas Petri estériles mediante homogenización en masa y se incubaban a la temperatura adecuada para cada microorganismo.

Adicionalmente, en algunos estudios se empleó un termorresistómetro adaptado para un menor volumen de trabajo, descrito por Raso y col. (1998). Este equipo consiste en un vaso principal de 700 ml, en el que se encuentra la cámara de tratamiento de 23 ml. El vaso principal contiene una resistencia y un serpentín de refrigeración, así como un sistema de agitación para homogeneizar la temperatura ya que termostata la cámara de tratamiento. Además, contiene sistemas de presurización y de extracción de muestras como en el caso del TR-SC. La ventaja que ofrece este equipo es que permite trabajar con suspensiones de esporos menos concentradas. El protocolo de trabajo fue igual que en caso anterior.

Para evaluar el porcentaje de esporulación o germinación, se realizaban pasterizaciones a 75 °C en un termobloque de aluminio con capacidad para 96 tubos de 1,2 ml (Incubador FX, Zeulab, Zaragoza, España). Para ello, se añadían 450 ul del medio de tratamiento y se inoculaban 50 ul de la suspensión microbiana a evaluar. Transcurrido el tiempo de tratamiento (30 min para *G. stearothermophilus* y 10 min para *B. subtilis*) se extraían 100 ul, que se sembraban en placa por homogenización en masa y se incubaban a la temperatura correspondiente de tratamiento (55 °C en *G. stearothermophilus* y 37 °C en *B. subtilis*).

Para los tratamientos térmicos se emplearon como medio de tratamiento tampones citrato-fosfato (McIlvaine) a diferentes pHs.



Figura 3.3. Fotografía del termobloque de aluminio empleado en esta tesis.

Por último, en el caso de los estudios de termorresistencia de los esporos durante el proceso de germinación se empleó un termobloque diseñado por el grupo de investigación. Este termobloque se trata de un bloque de aluminio, donde se introducían viales de vidrio con el medio de tratamiento, conectado a una resistencia. Para evaluar la termorresistencia se introducía la cantidad adecuada de esporos y se extraían muestras a lo largo del tiempo.



Figura 3.4. Fotografía del termobloque empleado en los estudios de termorresistencia de esporos parcialmente germinados.

3.3. Tratamientos con Altas Presiones Hidrostáticas (APH)

Los experimentos se realizaron en un equipo de APH de Stansted Fluid Power modelo S-FL-085-09-W (Harlow, London, England), que permite alcanzar una presión

máxima de trabajo teórica de 800 MPa, Sin embargo, en el desarrollo de esta tesis tan solo se pudo alcanzar 400 MPa. Este equipo dispone de una cámara de tratamiento de 30 ml, en la que se introducen las muestras perfectamente termoselladas en bolsas de polietileno estéril (Coimbra Pack S.L., Zaragoza, España) procurando evitar la presencia de burbujas de aire. Una vez aplicado el tratamiento, las bolsas se abrían con unas tijeras previamente esterilizadas y se extraían las muestras para su posterior análisis.



Figura 3.4. Fotografía del equipo de altas presiones hidrostáticas.

3.4. Tratamientos de Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEAV)

Para la determinación de la resistencia a los PEAV se utilizó un equipo suministrado por la empresa ScandiNova (Modulator PG, ScandiNova, Uppsala, Suecia). El equipo consta básicamente de un transformador (DCPS D10-400, ScandiNova) que convierte la corriente trifásica alterna (380 V, 16 A) en corriente continua de 1 kV, la cual es transferida a 6 interruptores IGBT conectados en serie (Switch rack SR-6, ScandiNova). Una señal eléctrica externa (TTL, 5 V) controla la apertura y cierre de los módulos IGBT, provocando la descarga de la corriente de 1 kV en una primera señal de onda cuadrada.

Finalmente, un transformador de pulso (Pulse transformer, ScandiNova) convierte esa primera señal pulsante en la señal de alto voltaje deseada. Con este circuito, el equipo es capaz de generar pulsos de onda cuadrada de 3 μ s de duración de hasta 30 kV de voltaje y 200 A de intensidad, a una frecuencia de hasta 300 Hz. El equipo está diseñado para trabajar con una cámara de tratamiento con una resistencia eléctrica óptima entre 100 y 170 Ω . En estas condiciones se consigue un pulso totalmente cuadrado, en el que el voltaje

aumenta hasta el valor establecido y, una vez terminado el pulso, desciende hasta voltaje cero. A lo largo de toda la duración del pulso, el voltaje alcanzado oscila menos de un 2%.

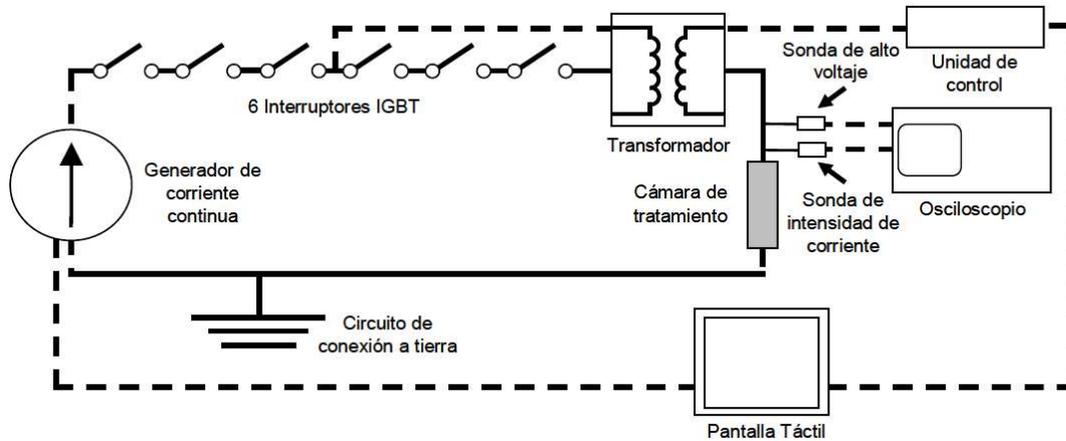


Figura 3.5. Esquema eléctrico del equipo de PEAV. Figura obtenida de Marcén (2018).

Las suspensiones microbianas se trataban en tubos de polietileno, cuyos extremos estaban cerrados por cilindros de acero inoxidable, que hacían de electrodos. La distancia entre los electrodos fue de 0,25 cm. Los tratamientos aplicados tenían una duración de pulso de 2 μ s y el tiempo máximo de tratamiento fueron 200 μ s. Las intensidades de campo eléctrico empleadas fueron 15, 20 y 25 kV/cm, que correspondía a una energía específica por pulso de 0,9, 1,6 y 2,5 kJ/kg, respectivamente. La frecuencia de aplicación de los pulsos fue de 0,5 Hz.

Los tratamientos se aplicaron en tampón citrato-fosfato (McIlvaine) pH 4 y 7, con una conductividad eléctrica de 2 mS/cm.



Figura 3.6. Fotografía del equipo de PEAV.

3.5. Tratamientos con radiación ultravioleta (UV)

Para los tratamientos con radiación ultravioleta se utilizó una instalación consistente en un habitáculo cerrado en el que están instaladas dos lámparas de ultravioleta y que dispone de un sistema que permite regular la distancia entre la muestra y las lámparas, para poder ajustar la intensidad de los tratamientos. Las lámparas de UV-C emitían a 254 nm de longitud de onda y la potencia eléctrica era de 32 W. La distancia entre la muestra y las lámparas se ajustó a 12,2 cm, a no ser que se indique lo contrario en el texto.



Figura 3.7. Fotografías de la instalación para el tratamiento con UV.

Los tratamientos se realizaron siguiendo dos procedimientos diferentes. Por un lado, en los casos en los que se pretendían realizar más estudios posteriores, el tratamiento con UV se aplicó colocando un volumen reducido de la suspensión microbiana (130 μ l) (a la dilución adecuada) en forma de gota en capa fina en una placa Petri estéril y vacía, a la cual se le retiraba la tapa. Tras el tratamiento se extraía la muestra y se procesaba.

Por otro lado, en los casos en los que tras el tratamiento con UV no se realizaba ningún tratamiento adicional, la suspensión microbiana, en la dilución adecuada, se sembraba en superficie en una placa Petri con ANYE estéril y, tras el tratamiento, se incubaba directamente.

Para comprobar que el tratamiento fuera de la intensidad deseada, se comprobaba la distancia entre la muestra y las lámparas. Adicionalmente, la fluencia obtenida se midió empleando un fotoradiómetro Delta Ohm HD2102.1 (Delta Ohm, Padua, Italia) al que se acoplaba una sonda LP 471 UVC con un rango de espectro de 220 nm a 280 nm.

Tabla 2. Equivalencia entre el tiempo de exposición a la radiación UV y la fluencia aplicada, para una distancia lámpara-muestra de 12,2 cm.

<i>Tiempo UV (seg)</i>	<i>kJ/cm²</i>
2	5,41
3	8,18
5	13,62
10	27,22
15	40,48

3.6. Tratamiento con germinantes

Para los tratamientos en los que se evaluaba la germinación con diferentes agentes, se emplearon varios agentes: nutrientes, Ca-DPA y HCl. En todos los casos, salvo que se especifique lo contrario, el tratamiento se aplicaba a temperatura ambiente controlada de 25 °C. Para ello, se utilizaba un termobloque de aluminio termostatable.

Los nutrientes empleados fueron glucosa (5,55 mM), L-alanina (50 mM), DL-valina (10 mM), AGFK (asparagina 2,5 mM, glucosa 5,55 mM, fructosa 5,55 mM y KCl 44 mM) (Sigma Aldrich, Milán, Italia), caldo nutritivo con extracto de levadura (Oxoid)

y las combinaciones L-alanina con valina y L-alanina con AGFK. Todos ellos se disolvían en agua destilada a la concentración deseada y se esterilizaban por filtración.

Por otro lado, el dipicolinato cálcico se preparaba disolviendo por separado el CaCl_2 (Sigma Aldrich) y el ácido dipicolínico (Sigma Aldrich), para después mezclar en proporción 1:1. Este último se disolvía en tampón Tris 0,5 M para obtener un pH de 7,0 y ambas soluciones se esterilizaban en autoclave. Las concentraciones empleadas de Ca-DPA fueron 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 90 mM. La temperatura de tratamiento fue, de forma general, 25 °C. Sin embargo, en algún caso se estudió el efecto de la temperatura de tratamiento (4, 10, 20, 30 y 35 °C), utilizando para ello tanto estufas como neveras a las temperaturas deseadas.

Por último, para los tratamientos con HCl se emplearon concentraciones de 0,03, 0,1, 0,2 y 0,3 N. En este caso también se estudió el efecto de la temperatura de tratamiento (15, 25, 37, 45 y 55 °C).

3.7. Evaluación de la germinación

i. Densidad óptica

Se trata de una forma sencilla de estudiar la germinación, ya que simplemente consiste en medir la absorbancia a 600 nm. Cuando los esporos germinan liberan parte del contenido del protoplasto y captan agua del medio extracelular, por lo que su densidad óptica disminuye (Gould y Sale, 1970; Keynan y col., 1964). En este caso, se emplearon dos equipos en función de las necesidades del experimento.

Por un lado, para algunas exploraciones acerca de la germinación por exposición a diferentes combinaciones de nutrientes se empleó un fluorímetro (Tecan Genios, Männedorf, Suiza). Para ello se introducían los esporos con el medio germinante en una placa microtiter (200 μL) y se hacían lecturas a 600 nm a lo largo del tiempo. Con los datos obtenidos se calculaba el porcentaje de descenso de la absorbancia comparando con los valores a tiempo cero, es decir de la suspensión de esporos sin haber entrado en contacto con el agente germinante, y se representaba el porcentaje a lo largo del tiempo.

Por otro lado, en la mayor parte de los casos, las muestras previamente tratadas con el agente germinante o tecnología, se centrifugaban y resuspendían en agua destilada

estéril para eliminar los restos del medio que pudieran influir en las medidas. Una vez resuspendidos, se medía su absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro de pequeño volumen (2 μ L) (SimpliNano, Thermo Fisher, Madrid, España). En este caso también se calculaba el porcentaje de descenso de densidad óptica comparando la absorbancia obtenida en esporos tratados frente al control (esporos nativos). Este equipo presenta la ventaja de requerir un muy inferior volumen de muestra, en comparación a un espectrofotómetro tradicional de cubeta o de placa microtiter. La Figura 3.8 muestra la equivalencia de las medidas obtenidas con un espectrofotómetro de cubeta y con el espectrofotómetro de pequeño volumen (SimpliNano) de varias diluciones de una suspensión de esporos de *B. subtilis*. Como se puede observar, los valores coincidían hasta un determinado punto, en torno a una absorbancia de 1,5, valor por encima del cual el SimpliNano ofrecía un mejor comportamiento (R^2 0,99).

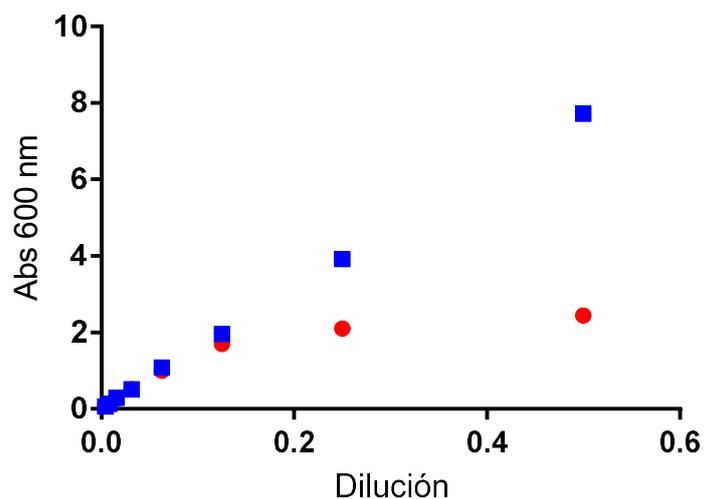


Figura 3.8. Relación entre las medidas de absorbancia obtenidas con un espectrofotómetro de cubeta (●) y con un espectrofotómetro de pequeño volumen (■) de distintas diluciones de una suspensión de esporos de *B. subtilis*.

ii. Pasterización

Esta es la metodología comúnmente aceptada para discernir entre un espora latente y uno germinado. Generalmente se asume que todo aquel espora que resista un tratamiento térmico de pasterización se encuentra en estado latente, mientras que cuando dicho tratamiento consigue inactivarlo, se trata de un espora germinado (Moir y Cooper, 2015; Rode y Foster, 1961).

En esta tesis se aplicó una pasterización a 75 °C, en termobloque de aluminio (Incubador FX, Zeulab), de 10 minutos para *B. subtilis* y de 30 minutos para *G. stearothermophilus*. Para calcular el porcentaje de germinación se hacían recuentos en placa Petri (ANYE) antes y después de la pasterización y se calculaba el porcentaje de reducción del recuento.

3.8.Salida DPA

En este estudio se evaluaron algunos cambios celulares asociados a la germinación, siendo uno de ellos la salida de DPA de los esporos. En el momento en el que el esporo empieza a germinar, la salida de DPA y entrada de agua es uno de los primeros eventos que ocurre en la fase I de la germinación (Moir y Cooper, 2015; Setlow, 2003).

Para la medida de DPA se empleó una metodología muy sencilla que nos resultaba útil para los propósitos de esta tesis, que consistía en medir la absorbancia a 270 nm del sobrenadante de los esporos en germinación (Setlow y col., 2003) con un espectrofotómetro de pequeño volumen de muestra (SimpliNano). A esta longitud de onda es previsible que se detecten otras moléculas, pero, en cualquier caso, nos daba una idea del intercambio de compuestos entre el medio intracelular y extracelular. Con los valores obtenidos también se calculaba el porcentaje de aumento de absorbancia (% salida DPA) a partir de las rectas de calibrado realizadas para cada microorganismo (Figura 3.10). La Figura 3.9 muestra las medidas de absorbancia a 270 nm de soluciones de DPA a distintas concentraciones, con los dos equipos de medida. También en este caso ambos equipos ofrecieron resultados similares hasta un determinado valor, por encima del cual la recta de calibrado obtenida con el SimpliNano seguía siendo adecuada (R^2 0,97 en espectrofotómetro de cubeta y 0,99 en SimpliNano).

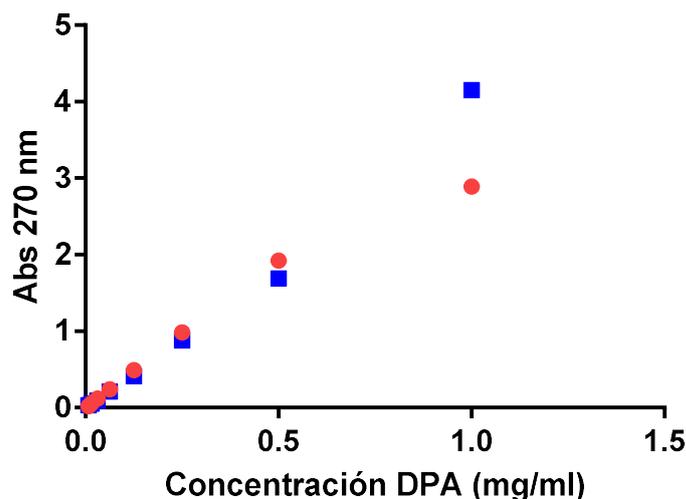


Figura 3.9. Medida de absorbancia a 270 nm de soluciones de DPA a varias concentraciones con un espectrofotómetro de cubeta (●) y con un espectrofotómetro de pequeño volumen (■).

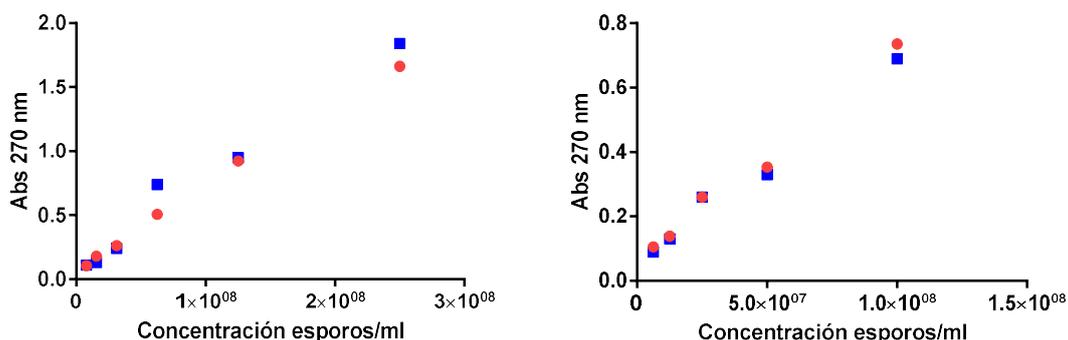


Figura 3.10. Recta de calibrado de salida de DPA en el sobrenadante de esporos autoclavados de *B. subtilis* (izquierda) y *G. stearothermophilus* (derecha) midiendo la absorbancia a 270 nm con un espectrofotómetro de cubeta (●) y con un espectrofotómetro de pequeño volumen (■). R^2 fue en todos los casos igual o superior a 0,97.

Por otro lado, se empleó también otra metodología para medir la salida de DPA de los esporos durante la germinación, que se basa en la fluorescencia que emite el complejo Tb-DPA (Kort y col., 2005).

En esta técnica, al contrario que en caso anterior, se medía el DPA que quedaba en los esporos tras el tratamiento germinante. Para ello, en primer lugar a los distintos

tiempos de germinación, se extraía una muestra que se centrifugaba (12000 g, 2 min) y resuspendía en agua destilada MiliQ, tres veces, para retirar tanto el medio de germinación (evitando así interferencias del mismo) como el DPA ya liberado al medio. Posteriormente los esporos se esterilizaban para permitir la salida del DPA que quedaba en su interior y se centrifugaban de nuevo para recoger el sobrenadante. Del sobrenadante obtenido se colocaban 42,5 ml en placas multipocillo aptas para fluorescencia, donde se añadía 15 µl de acetato sódico 1M acidificado a pH 5,50 con ácido clorhídrico, 85 µl de agua MiliQ y 3,5 µl de TbCl₃ 0,1M (Sigma Aldrich). Por último, se medía la fluorescencia con un fluorímetro (Clariostar plus, BMG Labtech, Madrid, España) empleando 270 nm de longitud de onda de excitación y 545 nm de longitud de onda de emisión y se calculaba el porcentaje de salida de DPA con respecto al control, es decir, con respecto a los esporos nativos esterilizados.

En la Figura 3.11 se muestra el espectro de emisión de una solución de DPA puro a una concentración de 1 mg/ml. Como se puede observar, el Tb-DPA presenta varios picos de emisión, con máximos a 490 y 545 nm de longitud de onda. La Figura 3.12 muestra el espectro de un extracto autoclavado de una suspensión concentrada de *B. subtilis*, cuyo perfil fue muy similar, también con un pico a 545 nanómetros.

La Figura 3.13 muestra las curvas patrón que representan la concentración de DPA puro y de esporos de *B. subtilis* frente a la fluorescencia emitida, tanto calculando el área bajo la curva correspondiente como la fluorescencia a 545 nm. Como se puede observar, en todos los casos se obtuvieron curvas patrón precisas, con valores de R² de 0,98 y 0,99, del área bajo la curva y la fluorescencia a 545 nm respectivamente, en el caso del DPA puro y 0,99 y 0,99, del área bajo la curva y la fluorescencia a 545 nm respectivamente, en los esporos de *B. subtilis*. Finalmente, dados estos resultados, se decidió obtener únicamente la fluorescencia a 545 nm como indicador de la concentración de DPA que quedaba en los esporos.

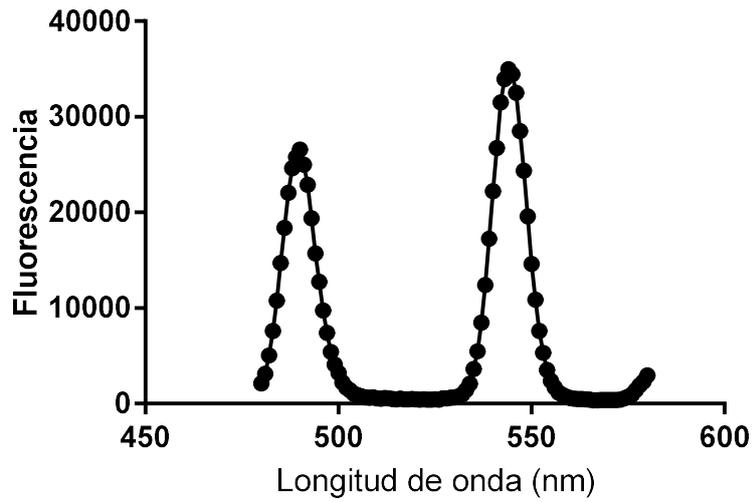


Figura 3.11. Espectro de emisión de una solución de DPA 1mg/ml.

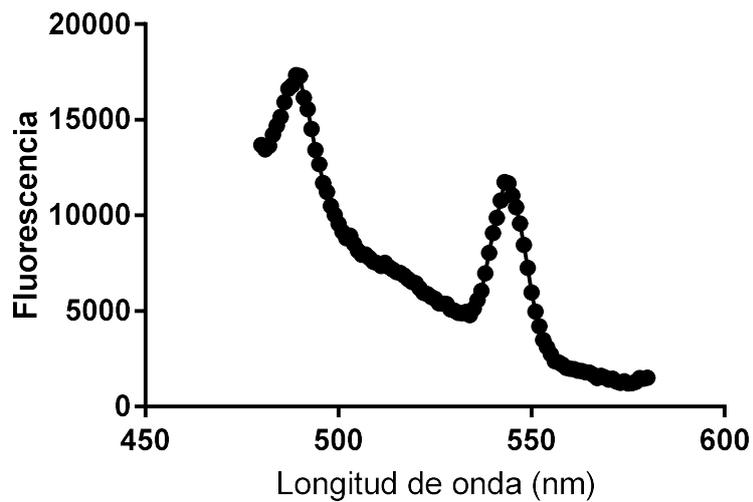


Figura 3.12. Espectro de emisión de una suspensión de *B. subtilis* con una concentración de 10^8 esporos/ml esterilizada.

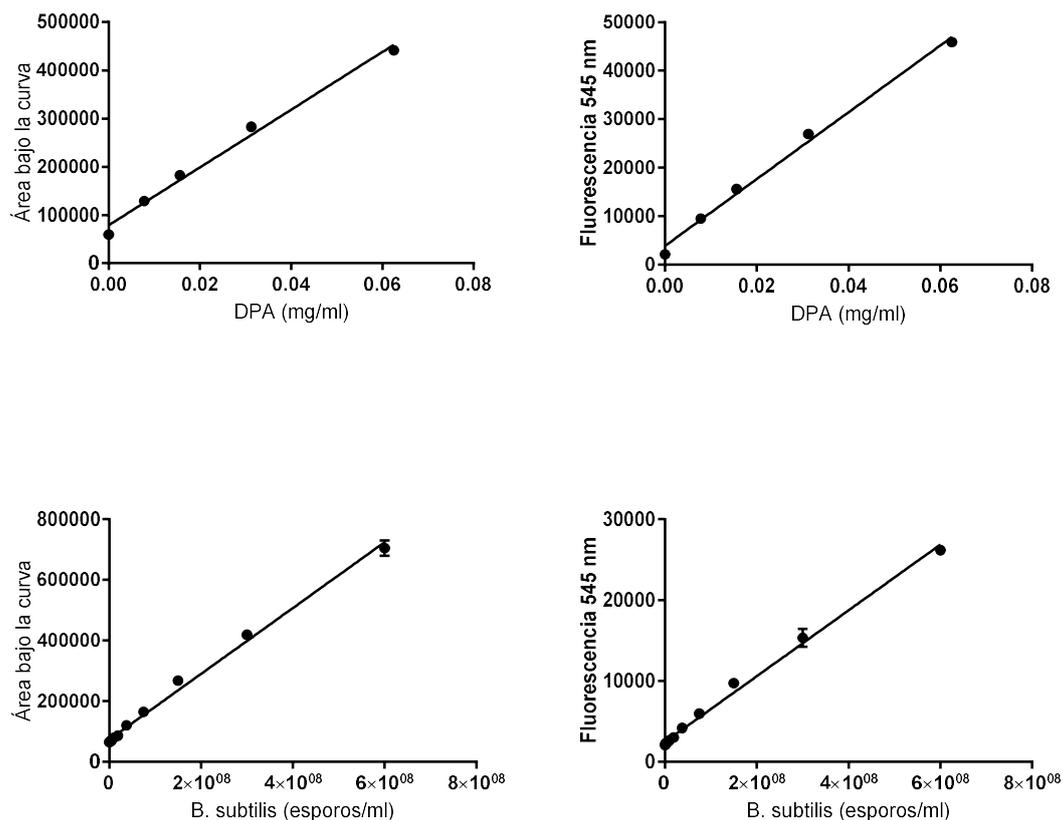


Figura 3.13. Curvas patrón con varias concentraciones de DPA puro y de esporos de *B. subtilis* representando el área bajo la curva del espectro de emisión y de la fluorescencia obtenida a 545 nm.

3.9. Tinción con IP y Syto 16

Para determinar daños o permeabilización de la membrana interna se utilizó yoduro de propidio (IP) (Sigma) (Loison y col., 2016). Además, se empleó Syto 16 (Life Technologies, Carlsbad, California, E.E.U.U.) para evaluar la hidrólisis del córtex, evento que tiene lugar en la fase II de la germinación (Setlow y col., 2003). Estos compuestos son fluorocromos capaces de emitir fluorescencia cuando se unen con su molécula diana que, en ambos casos, es el material genético.

El yoduro de propidio es incapaz de atravesar la membrana cuando esta se encuentra íntegra, mientras que sí que puede atravesarla y unirse a su diana cuando esta se ve comprometida. En este caso, al unirse al ADN y ARN emite fluorescencia de color rojo (Johnson, 2010).

El Syto 16 por otro lado, no es capaz de atravesar el córtex del esporo, por lo que tan solo puede unirse al DNA cuando éste se ha permeabilizado. La fluorescencia la emite en color verde y se utiliza para estudiar la germinación de los esporos sometidos a distintos agentes (Tehri y col., 2018).

Para estas pruebas, se centrifugaban las muestras (14.000 r.p.m. durante 2 minutos) (miniSpin plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemania), salvo en el caso de los tratamientos ácidos (10.000 r.p.m. durante 15 minutos) y se resuspendían en agua destilada estéril (en los tratamientos ácidos se resuspendían en agua destilada estéril con la misma concentración de NaOH que la empleada de HCl en el tratamiento, para neutralizar). Posteriormente se añadía el colorante y se dejaban en contacto durante 15 minutos en oscuridad. Por último, se centrifugaba de nuevo para retirar el exceso de colorante y se medía la fluorescencia con un fluorímetro o mediante observación microscópica.

Las concentraciones de colorante fueron en el caso de IP en *B. subtilis* 4 μM , mientras que en *G. stearothermophilus* fue de 1 μM . Por otro lado, en el caso del Syto 16, la concentración empleada en ambos microorganismos fue 15 μM , pero en el caso de *G. stearothermophilus*, de forma previa a la tinción con este colorante, los esporos se incubaban durante 45 minutos en caldo nutritivo con extracto de levadura, después se centrifugaban y se añadía el colorante. Las condiciones de tinción se explican con más detalle en el capítulo 2 de la sección de Resultados y Discusión.

Para estudiar la fluorescencia obtenida con IP y Syto 16 se emplearon tres equipos, en función de las necesidades del experimento.

En primer lugar, para la puesta a punto de las condiciones de tinción se empleó un fluorímetro (Tecan Genios, Männedorf, Suiza). Para ello, una vez teñidos y lavados los esporos, se colocaban 100 μl de la suspensión en placas microtiter negras y se medía la fluorescencia. En el caso del IP la longitud de onda de excitación fue 485 nm y de emisión 650 nm. Para el Syto 16 las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 485 y 515 nm, respectivamente. Con los valores obtenidos se calculaba el porcentaje de aumento de la fluorescencia con respecto a los esporos nativos y se representaban los porcentajes frente a los diferentes tiempos de tratamiento empleados. Adicionalmente se realizaron medidas también con otro fluorímetro CLARIOstar Plus (BMG LABTECH, Ortenberg,

Alemania), de reciente adquisición en nuestro laboratorio, siguiendo el mismo protocolo que en el caso anterior.

Por otro lado, se utilizó un microscopio de contraste de fases y epifluorescencia (Nikon Eclipse E400, Nikon Corporation, Japón), provisto con una cámara de alta resolución AxioCam MRc (Zeiss, Alemania), a través de la cual se obtuvieron imágenes en formato digital, que fueron procesadas mediante el software ZEN 2012 (Zeiss, Alemania). Para ello, una vez transcurrido el tiempo de tinción y lavados para retirar el exceso de colorante, se colocaban 2 μ l de la suspensión de esporos en un portaobjetos y se cubrían con un cubreobjetos. Los esporos se observaban con el objetivo de $\times 40$ de contraste de fases y se captaban imágenes, tanto de esporos totales, como de esporos fluorescentes utilizando los filtros de los que dispone el microscopio (UV-2A (EX 330-380), G-2A (EX 510-560) y B-2A (EX 450-490)). De cada muestra se realizaron al menos tres fotografías para conseguir un número de esporos que fuera representativo. Una vez obtenidas las imágenes, se calculaba el porcentaje de esporos teñidos, mediante la diferencia del recuento entre los esporos totales y los fluorescentes.

3.10. Determinación de fluidez de membrana mediante polarización generalizada con laurdan y mediante anisotropía con DPH

Para la determinación de la fluidez de la membrana interna en *B. subtilis* se empleó, en primer lugar, el colorante Laurdan (6-Dodecanoyl-N,N-dimethyl-2-naphthylamine) (Sigma), que se añadía al medio de esporulación siguiendo la metodología empleada por Hofstetter y col. (2012). Para estas pruebas fue necesario preparar suspensiones de esporos en medio sólido. El medio de esporulación fue 2 \times SG con agar bacteriológico 1,5% (Oxoid). Una vez solidificado el agar, se distribuía en su la superficie una solución de etanol con el colorante (0,1 M) y se dejaba evaporar el etanol. Por último, se inoculaban las células vegetativas del microorganismo y se incubaba a la temperatura correspondiente (30 o 42 °C) hasta que el porcentaje de esporos superaba el 90%.

Con las suspensiones de esporos con laurdan se obtenía el espectro de emisión (entre 360 y 600 nm) a una longitud de onda de excitación de 350 nm, y se calculaba la polarización generalizada (GP) mediante la siguiente ecuación:

$$GP = \frac{(I_{440} - I_{490})}{(I_{440} + I_{490})} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde I_{440} es la intensidad de fluorescencia obtenida a 440 nm e I_{490} la intensidad obtenida a 490 nm.

Por otro lado, también se empleó para caracterizar la fluidez de la membrana el colorante 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH). Las características hidrofóbicas del colorante le permiten insertarse en la membrana lipídica de las células (de Sarrau y col., 2012). Para estas pruebas los esporos se centrifugaban y resuspendían en PBS y se añadían 10 μ l de la solución stock de DPH (10 mM en dimetilformamida (DMF)) por cada 1 ml y se incubaban a 37 °C durante 45 minutos. Posteriormente se realizaban las medidas empleando 350 nm como longitud de onda de excitación y 450 nm de longitud de onda de emisión. Para las medidas, la luz de excitación se encontraba polarizada en sentido vertical y la de emisión tanto en vertical como en horizontal. Con los valores obtenidos, el software realiza los cálculos para obtener la anisotropía y la polarización (Ecuaciones 2 y 3 respectivamente).

$$\text{Anisotropía} = \frac{(I_{\text{paralelo}} - I_{\text{perpendicular}})}{(I_{\text{paralelo}} + 2 * I_{\text{perpendicular}})} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$\text{Polarización} = \frac{(I_{\text{paralelo}} - I_{\text{perpendicular}})}{(I_{\text{paralelo}} + I_{\text{perpendicular}})} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde I_{paralelo} es la fluorescencia obtenida con la luz polarizada de emisión en sentido paralelo e $I_{\text{perpendicular}}$ corresponde a los datos obtenidos con luz polarizada de emisión en sentido perpendicular.

En todos los casos se realizaban medidas de los esporos sin teñir y se restaban a los valores obtenidos con los esporos teñidos.

3.11. Modelización cinética de inactivación por calor

Para estudiar las cinéticas de inactivación por calor, se empleó el modelo de (Geeraerd y col., 2000) mediante el complemento de excel GInaFit (Geeraerd y col., 2005) (Ecuación 2).

$$N_t = N_0 \times e^{-K_{max} \times t} \left(\frac{e^{-K_{max} \times Sl}}{1 + (e^{K_{max}} - 1)e^{-K_{max} \times t}} \right) \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde N_t es el recuento microbiano obtenido en un tiempo determinado de tratamiento, N_0 es el recuento microbiano antes de iniciar el tratamiento, K_{max} es la velocidad de inactivación y Sl es la longitud del fenómeno de hombro. A partir de la K_{max} se obtiene el valor D a través de la ecuación 3.

$$D_T = \frac{2,303}{K_{max}} \quad \text{Ecuación 3}$$

Adicionalmente, para poder comparar la termorresistencia entre distintos microorganismos, se calculó el valor $4D_T$ mediante la ecuación 4 y se calcularon los valores $z-Sl$ (Condón-Abanto y col., 2016). El valor $z-Sl$ se define como el aumento requerido de temperatura necesario para reducir diez veces el valor Sl .

$$4D_T = Sl + (4 \times D_T) \quad \text{Ecuación 4}$$

Por otro lado, en los casos en los que se evaluaron varios modelos, se calcularon varios parámetros que muestran la bondad del ajuste:

- **Coefficiente de determinación (R^2):** este valor determina la idoneidad del modelo para estimar los resultados y la proporción de variación de los resultados que puede explicarse por el modelo. El modelo es más idóneo cuanto más cerca de 1 se encuentre este parámetro.
- **Raíz cuadrada del error cuadrático medio (RMSE):** se trata de la raíz cuadrada de la diferencia del promedio de los errores (diferencia entre valores observados y predichos por el modelo) al cuadrado. El modelo es más adecuado cuanto menor sea este parámetro.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\text{predichos}_{(n)} - \text{observados}_{(n)})^2}{n}} \quad \text{Ecuación 5}$$

- **Factor de precisión (A_f):** se trata de un indicador de la confianza con que el modelo puede ser empleado y ofrece una medida absoluta del ratio entre los

valores observados y los estimados por el modelo. El modelo sería más adecuado cuanto más se acercase al valor 1.

$$A_f = 10^{\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\text{Log}_{10} \left(\frac{\text{predichos}_{(n)}}{\text{observados}_{(n)}} \right) \right)^2}} \quad \text{Ecuación 6}$$

- **Factor de sesgo (B_f):** se trata de un indicador del sentido de las desviaciones entre los valores observados y los predichos por el modelo. Si los valores de este parámetro son superiores a 1, indicaría que el modelo está sobreestimando, mientras que, si son inferiores a 1, el modelo estaría infravalorando en las estimaciones. Por tanto, las condiciones ideales serían lo más cercanas al valor 1.

$$B_f = 10^{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \text{Log}_{10} \left(\frac{\text{predichos}_{(n)}}{\text{observados}_{(n)}} \right)} \quad \text{Ecuación 7}$$

- **Índice de exactitud:** se trata de un parámetro que mide el porcentaje de los valores estimados por el modelo que están sobreestimando (si B_f es mayor de 1) o subestimando (si B_f es menor de 1) los valores reales.

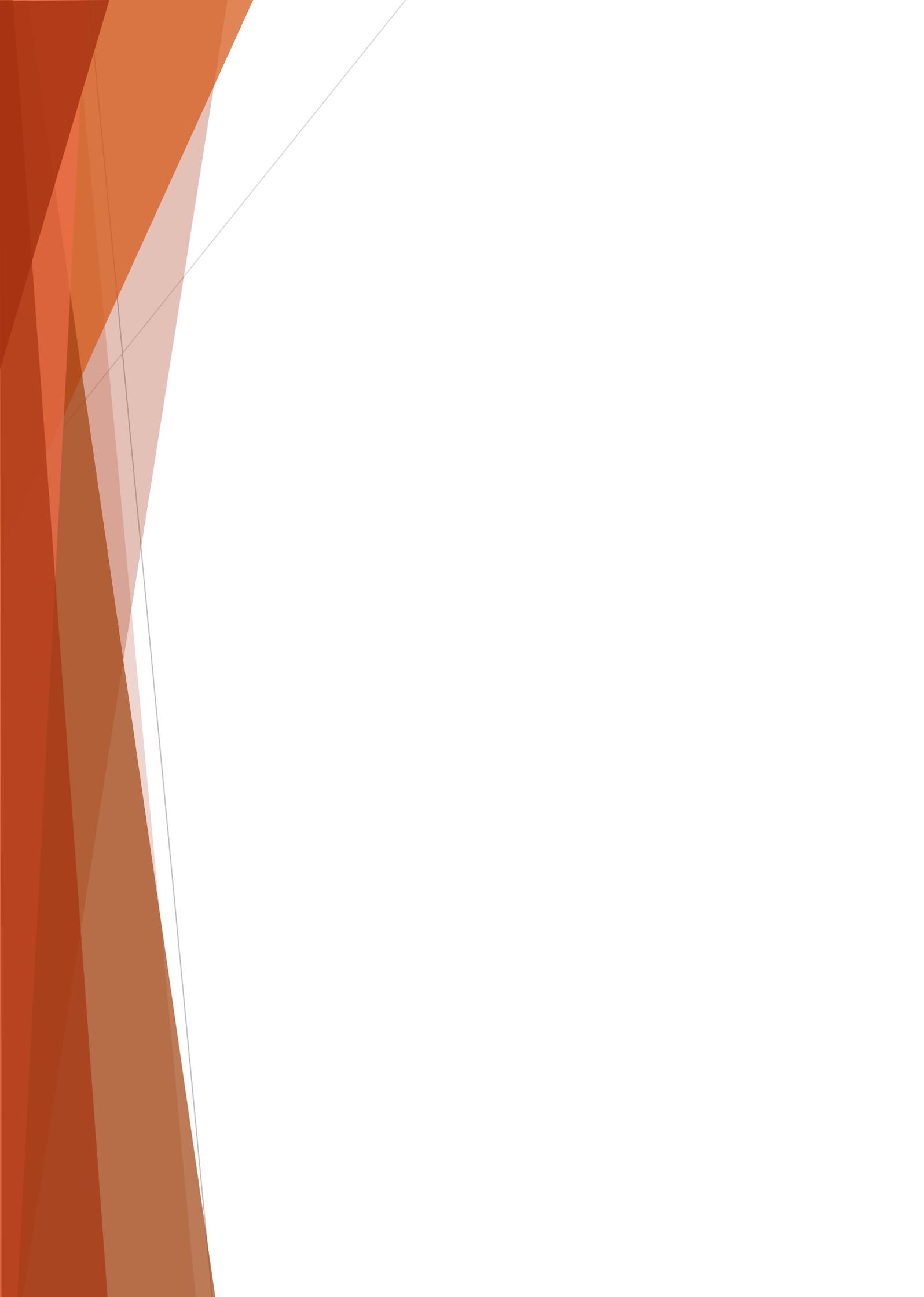
$$IE = (A_f - 1) * 100 \quad \text{Ecuación 8}$$

3.12. Análisis estadístico de los datos

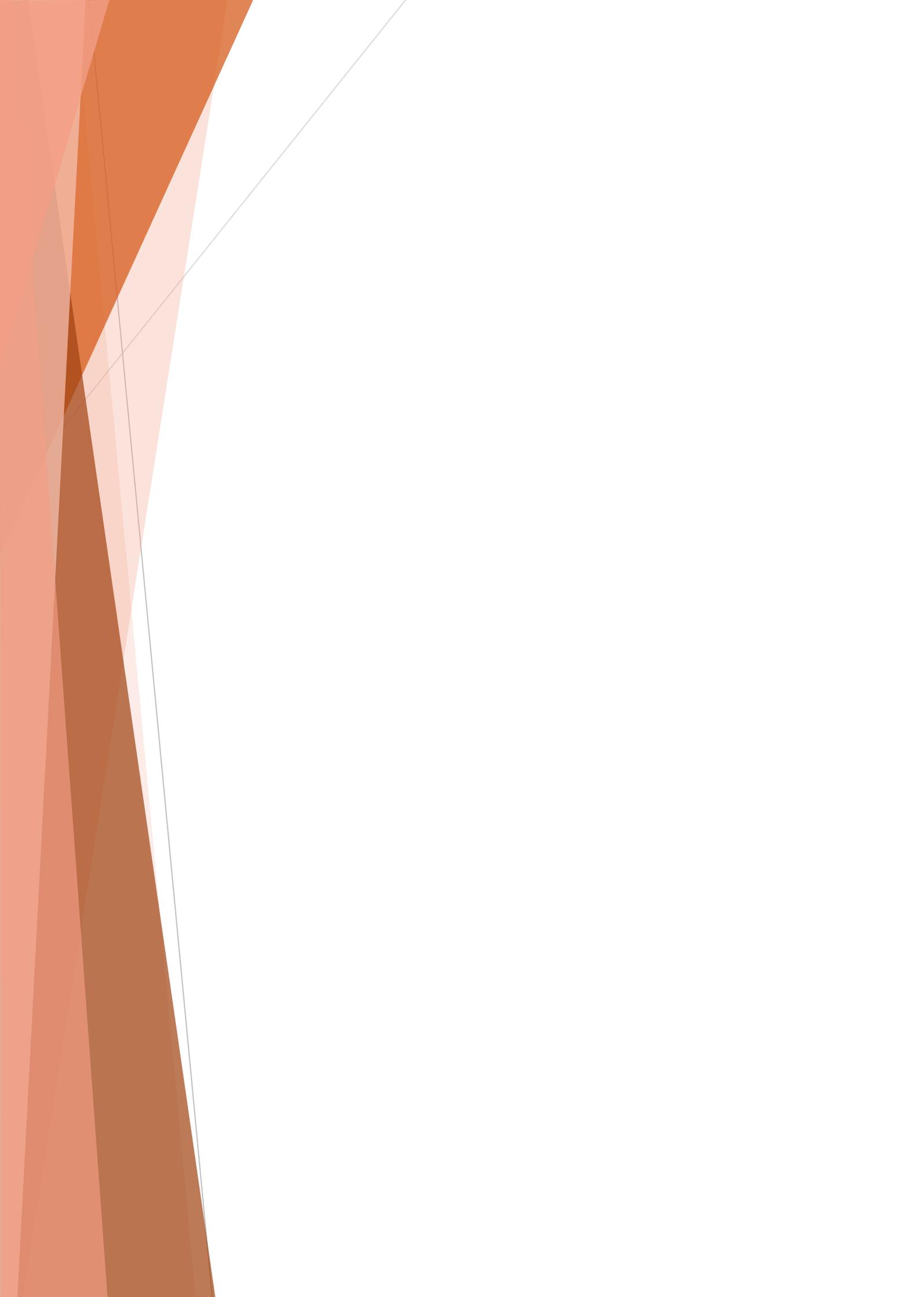
De forma general, y salvo que conste de forma explícita en el capítulo correspondiente, todas las determinaciones se realizaron al menos por triplicado.

Los análisis estadísticos realizados se llevaron a cabo mediante el programa GraphPad PRISM (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, E.E.U.U.) utilizando el test one-way Anova, comprobando de forma previa que la distribución fuera normal, mediante el test de normalidad Shapiro-Wilk. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p \leq 0,05$. Las barras de error que se muestran en las figuras corresponden a la desviación estándar de la media.

4. Resultados y discusión



4.1. Desarrollos metodológicos



4.1.1. Estudio de las condiciones de esporulación de *G. stearothermophilus*

4.1.1.1. Estudio del crecimiento vegetativo

Para los estudios de superlatencia, en esta tesis decidimos emplear *G. stearothermophilus* debido al elevado porcentaje de esporos superlatentes que presenta (alrededor del 90%). Sin embargo, uno de los problemas que plantea este microorganismo es el bajo rendimiento de esporulación que se obtiene, incluso en condiciones que resultan óptimas para otras especies esporuladas. Por tanto, el primer paso fue desarrollar unas condiciones de esporulación que resultasen adecuadas para *G. stearothermophilus*, para obtener suspensiones con una elevada concentración de esporos, lo que facilitaría los estudios posteriores.

En esta investigación se abordaron dos estrategias, por un lado, se estudió el crecimiento de las células vegetativas, dado que, a mayor número de estas, mayor número de esporos se podrían obtener. Por otro lado, también se probaron distintas condiciones de esporulación para seleccionar aquellas en las que se obtuviera el mayor número de esporos.

Como se ha mencionado, el primer paso fue estudiar el efecto del caldo de cultivo empleado en el crecimiento vegetativo. En este sentido se emplearon distintos medios: caldo nutritivo (CN) (Oxoid, Madrid, España), caldo triptona soja (TSB) (Oxoid), caldo infusión cerebro corazón (BHI) (Oxoid) y un caldo suministrado por la empresa Zeulab (Zaragoza, España). Los resultados se muestran en la Figura 4.1.1.

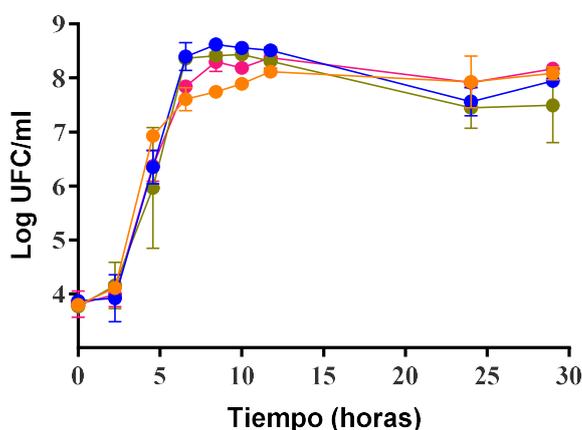


Figura 4.1.1. Curvas de crecimiento de *G. stearothermophilus* en: ● CN, ● TSB; ● BHI y ● Zeulab.

Como se puede apreciar en la Figura 4.1.1, el recuento máximo en ningún caso alcanzó las 9 unidades logarítmicas, como resulta habitual en las especies vegetativas cuando alcanzan la fase estacionaria. Por otro lado, se observa que el crecimiento en los medios BHI y TSB fue más rápido y alcanzaba un mayor recuento en las fases iniciales de la fase estacionaria. Sin embargo, al prolongar el tiempo de incubación se aprecia que la fase de autoesterilización se iniciaba rápidamente, de forma que, transcurridas 30 horas los recuentos en AN y Zeulab podrían llegar a ser incluso mayores, aunque el estudio estadístico no permitió apreciar diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Cabe destacar que los medios BHI y TSB son medios complejos y ricos en nutrientes, que suelen ser adecuados en el cultivo de microorganismos con grandes exigencias nutricionales. Quizá sea este el motivo por el cual los recuentos máximos alcanzados fueron mayores en estos medios. Sin embargo, tras 25 horas de incubación, la viabilidad en estos dos medios se redujo casi en un 90%. Este comportamiento podría deberse a varios fenómenos: por un lado, al agotamiento de algunos nutrientes esenciales para la supervivencia celular o a la acumulación de residuos tóxicos derivados del metabolismo o, por otro lado, a un descenso del pH. Para explorar estas hipótesis se añadieron al medio más rico, BHI varios compuestos: glucosa, que actuaría como fuente de energía adicional; carbonato cálcico, que evitaría un descenso brusco del pH (Ingraham y col., 1992) y almidón, que absorbe inespecíficamente sustancias tóxicas (Foster y col., 1950) (Figura 4.1.2).

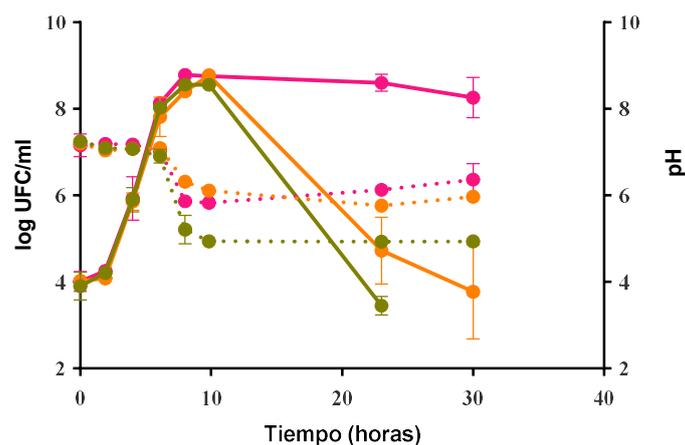


Figura 4.1.2. Curvas de crecimiento de *G. stearotherophilus* (línea continua) y evolución del pH (línea discontinua) en: (●) BHI, (●) BHI con glucosa (1%) y CaCO₃ (2,5g/L), (●) BHI con almidón (12g/L).

Como muestra la Figura 4.1.2, el recuento de las células vegetativas en la fase exponencial era muy semejante y el recuento alcanzado al inicio de la fase estacionaria también. Sin embargo, a las 30 horas de incubación el recuento se redujo en todos ellos, aunque fue menor en el caldo BHI. En este caldo, el recuento se redujo aproximadamente medio ciclo logarítmico, mientras que en las otras dos condiciones la reducción fue mayor de cuatro ciclos logarítmicos. Por otro lado, también el pH se redujo con el tiempo de incubación, llegando en los tres casos a reducirse al menos una unidad. Era esperable que la adición de glucosa produjese una bajada adicional del pH que, a juzgar por las gráficas de la figura 4.1.2, fue compensado con la adición de carbonato cálcico. Estos resultados parecen indicar que el pH, al menos al nivel alcanzado (pH 6,0), no era la causa de la autoesterilización observada, ya que esta fue mucho más intensa en los medios con glucosa y carbonato cálcico y con almidón, mientras que el pH del medio con glucosa y carbonato cálcico se mantuvo a niveles similares al observado en caldo BHI sin aditivos. Por debajo de pH 6, este factor sí podría ser importante, dado que en el medio enriquecido con almidón el pH alcanzó un valor de 5 y la autoesterilización fue más rápida.

El almidón, que en este caso se empleó como detoxificante, no ejerció el efecto esperado o quizá la autoesterilización no se debiera a la generación de sustancias tóxicas. Un aspecto que podría justificar la ineficacia del almidón es que este microorganismo podría ser capaz de emplearlo como fuente de energía, ya que algunas cepas de esta especie son capaces de metabolizar el almidón (Rowe y col., 1975). El metabolismo del almidón conlleva la formación de ácido láctico por la actividad alfa-amilásica (Smerilli y col., 2015), lo que podría explicar la bajada de pH y la fase acelerada de autoesterilización.

En cualquier caso, los resultados obtenidos indicaban que de entre las condiciones empleadas, el caldo BHI, sin ningún aditivo, fue el más adecuado para el crecimiento de las células vegetativas. Sin embargo, este factor resultó relativamente poco importante en el crecimiento de esta especie, aunque podría influir en gran medida en la velocidad de muerte posterior.

4.1.1.2. Estudio del efecto de la agitación en el crecimiento vegetativo

Un aspecto importante en el crecimiento de microorganismos aerobios es la tasa de oxígeno. De forma habitual los cultivos en medio líquido se incuban en agitación para

favorecer la aireación del medio, aunque su efecto puede ser muy variado dependiendo de la especie. Hay que tener en cuenta que el umbral de saturación de los gases en los medios líquidos disminuye con la temperatura y, puesto que *G. stearothermophilus* es una especie termófila, la aireación del medio podría ser especialmente importante. De hecho, algunos autores han señalado que la baja solubilidad del oxígeno en medio líquido a elevadas temperaturas podría ser un factor limitante en el crecimiento y esporulación de las especies termófilas (Long y Williams, 1960). Imšenecki y Solnzeva (1945) observaron que la aireación de los cultivos de especies termófilas aceleraba el crecimiento vegetativo. Por este motivo se decidió explorar el efecto de la agitación en el crecimiento vegetativo, a dos temperaturas. La Figura 4.1.3 muestra los datos obtenidos.

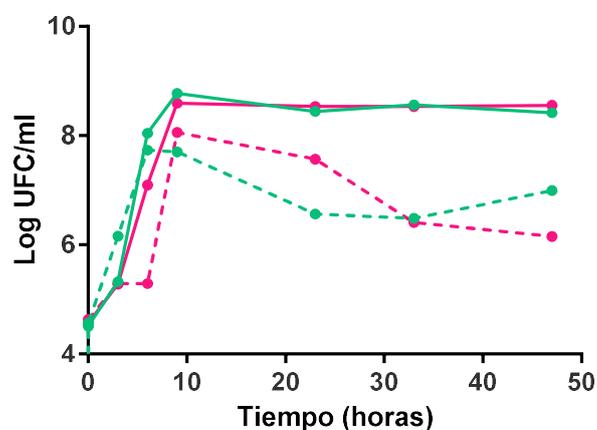


Figura 4.1.3. Crecimiento de *G. stearothermophilus* en BHI a (●) 42°C y (●) 52°C con (línea continua) y sin agitación (130 rpm) (línea discontinua).

Tal y como se aprecia en la Figura 4.1.3, el ritmo de crecimiento y de autoesterilización en agitación fueron ligeramente más lentos que en los experimentos anteriores, lo que podría estar relacionado con la menor temperatura de crecimiento. Sin embargo, este parámetro afectaba cuantitativamente poco al comportamiento de esta especie.

Por el contrario, la agitación del cultivo influyó de manera muy notable en las curvas de crecimiento. Cuando no se agitaba, el recuento máximo alcanzado fue menor y se aceleró muy notablemente el ritmo de autoesterilización. Estos resultados apoyan los obtenidos previamente por otros investigadores (Long y Williams, 1960), quienes observaron que la aireación de los cultivos aumentaba el crecimiento. Además, Long y Williams (1960) observaron que el crecimiento de *G. stearothermophilus* sin aireación

producía un descenso mayor del pH, es decir, cuando el cultivo se producía en ausencia de aireación, el pH se reducía hasta 5,5, mientras que con ritmos de aireación de 500 ml/min/L o superiores, el pH se mantenía en torno a 7,2 – 7,8. Este fenómeno podría explicar la mayor autoesterilización observada en la Figura 4.1.3 en los cultivos sin agitación. Estos cambios de pH parecen ser característicos del crecimiento en condiciones de baja tensión de oxígeno (Long y Williams, 1960). Por otro lado, Thompson y Thames (1967) observaron que flujos de aire por encima de 1,3 L/min/L parecían reprimir la esporulación de *G. stearothermophilus*, sin embargo estos resultados también se podrían deber a una rápida germinación de los esporos formados. En cualquier caso, parece que la concentración de oxígeno juega un papel importante en el crecimiento de esta especie y en la autoesterilización posterior. Por ello, se decidió controlar la aireación, asegurando la agitación del medio y aumentando la relación superficie/volumen, lo que aumentaría la superficie de contacto entre el aire y el medio de cultivo.

4.1.1.3. Esporulación de *G. stearothermophilus* en diferentes medios

Tras conocer el efecto del medio de cultivo en el crecimiento de las células vegetativas, el siguiente paso fue intentar mejorar el porcentaje de esporulación. En una primera fase se decidió emplear como medio de referencia del caldo BHI, ya que había sido el que mejores resultados había ofrecido en el crecimiento vegetativo.

En la bibliografía se ha descrito que los medios complejos podrían contener compuestos que inhibieran de alguna forma la esporulación (Foster y col., 1950), principalmente ácidos grasos insaturados, que inhibirían la proteína kinasa necesaria para iniciar la esporulación (Strauch y col., 1992). Además también sabemos que algunos microorganismos son capaces de producir y liberar compuestos antimicrobianos (Cleveland y col., 2001). Por otro lado, se ha descrito que algunas células de *B. subtilis*, durante la esporulación, son capaces de secretar al medio compuestos antimicrobianos que producen la muerte de las células hermanas que no están esporulando (González-Pastor, 2011; González-Pastor y col., 2003). Por todo ello, se decidió estudiar el efecto de la adición de alguna sustancia que secuestrase de forma inespecífica sustancias tóxicas. Dado que ya habíamos observado que esta cepa probablemente era capaz de utilizar el almidón como fuente de energía, se decidió emplear carbón activo “charcoal”, cuyos efectos beneficiosos habían sido descritos por otros investigadores (Foster y col., 1950).

Por otro lado, se estudió también el efecto de la adición de manganeso en la esporulación, ya que es comúnmente conocida su capacidad para estimular la esporulación y, lo que es más importante, para sincronizarla (Charney y col., 1951).

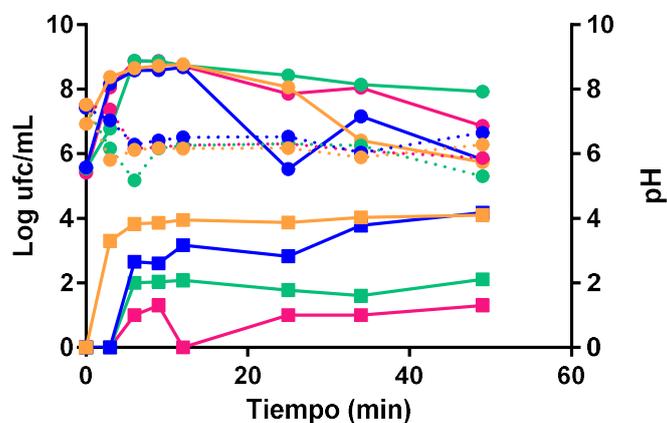


Figura 4.1.4: Curvas de crecimiento (●), de esporulación (■) y de evolución del pH (líneas discontinuas) de *G. stearothermophilus* en distintos medios: (●) BHI, (●) BHI con carbón activo (0,02%), (●) BHI con MnSO₄ (3ppm) y (●) BHI con carbón activo (0,02%) y MnSO₄ (3ppm).

Como se puede ver en la Figura 4.1.4, el crecimiento de las células vegetativas fue similar en todos los casos, en cuanto al recuento máximo obtenido, así como la evolución del pH. Por el contrario, el número de esporos que se obtuvo dependió de los aditivos adicionados.

Tras el crecimiento exponencial e inicio de la fase estacionaria, se produjo una rápida oleada de esporulación, aunque el porcentaje de células que esporularon fue diferente en los distintos medios, como se ha indicado. El medio en el que se observaron menos esporos fue el caldo BHI, en el que menos de 1 de cada 10^7 células vegetativas fue capaz de esporular. Es posible que en este medio la tasa de esporulación sea baja por la escasa concentración de sales minerales (Foster y Heiligman, 1949), especialmente de manganeso. Cuando este medio contenía también carbón activo, el porcentaje de esporos fue aproximadamente diez veces mayor, lo que parece confirmar que durante la esporulación se producen sustancias que inhiben la esporulación y que este compuesto es capaz de absorberlas. Sin embargo, el efecto observado fue pequeño, quizá debido a la baja tasa de esporulación, que daría lugar a una baja concentración de tóxicos en el medio.

Por otro lado, la presencia de manganeso en el medio mejoró prácticamente dos ciclos logarítmicos el rendimiento de la esporulación frente al obtenido en medio BHI. Sin embargo, en este caso la esporulación fue lenta y el recuento máximo se encontró a las 50 horas de incubación.

Por último, cuando se adicionaban los dos compuestos, carbón activo y MnSO_4 , se encontraron los mejores resultados ya que, además de aumentar la concentración de esporos, esta se producía de forma rápida y sincronizada. El hecho de que la esporulación se dé de forma sincronizada es beneficioso, ya que limita las variaciones entre individuos dentro de una misma suspensión.

En cualquier caso, el rendimiento máximo de esporos alcanzado fue muy pobre (10^4 ufc/ml), por lo que se decidió estudiar el comportamiento en otros caldos de cultivo. Algunos autores han descrito que los medios ricos, como el BHI, pueden no ser adecuados para la esporulación (Foster y Heiligman, 1949), por lo que se decidió estudiar la formación de esporos en el medio suministrado por Zeulab, comparándolo con el medio BHI empleado hasta ahora. El medio suministrado por Zeulab es un medio más pobre y su composición engloba una gran cantidad de minerales.

En este experimento se estudiaron los medios BHI y el suministrado por la empresa Zeulab con y sin carbón activo, CaCO_3 y MnSO_4 .

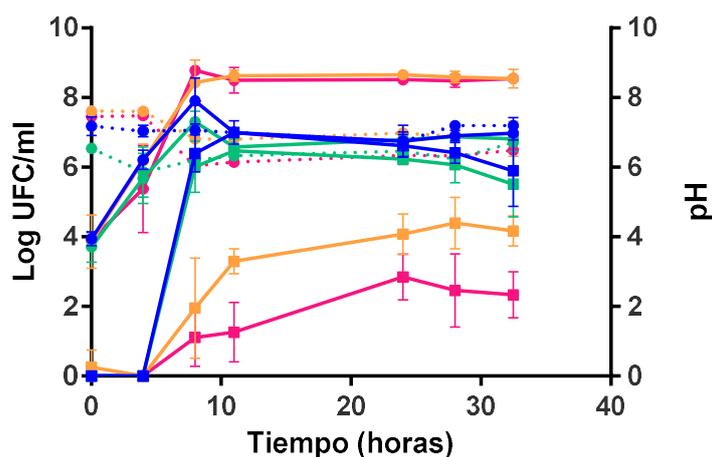


Figura 4.1.5. Curvas de crecimiento (●), esporulación (■), y evolución del pH (línea discontinua) en distintos medios: (●) BHI, (●) BHI con carbón activo (0,02 %), MnSO_4 (3 ppm) y CaCO_3 (2,5 g/L), (●) Medio ZEU y (●) Medio ZEU con carbón activo (0,02 %), MnSO_4 (3 ppm) y CaCO_3 (2,5 g/L).

En la Figura 4.1.5 se puede observar que la adición de carbonato cálcico (CaCO_3) y carbón activo mejoró el rendimiento de esporulación en ambos medios, tanto en BHI como en el medio de Zeulab. Sin embargo, dicha mejora fue más evidente en el medio BHI. Cabe destacar que en el medio de Zeulab, la esporulación fue mucho más rápida en todas las condiciones y el recuento máximo alcanzado superó en más de 100 veces los obtenidos en BHI, enriquecido o no.

Estos resultados parecen indicar que los medios con menor cantidad de materia orgánica y mayor concentración de minerales son, como ya observaron Foster y col. (1950), más adecuados para la preparación de suspensiones de esporos.

Con estos resultados, las condiciones seleccionadas para preparar las suspensiones de trabajo fueron: medio de Zeulab, incubación a 55 °C y agitación intensa. En cuanto a la adición o no de los aditivos probados, se decidió no añadirlos porque, a pesar de que mejoraban ligeramente el rendimiento, su presencia dificultaba notablemente el lavado posterior de los esporos. En estas condiciones de esporulación se obtuvo una suspensión de *G. stearothermophilus* con aproximadamente un 90% de esporos superlatentes, lo que permitió estudiar la superlatencia posteriormente a lo largo de esta tesis.

4.1.2. Puesta a punto de las técnicas de tinción con fluorocromos

Las tinciones con fluorocromos específicos son técnicas muy utilizadas en estudios biológicos. Sus aplicaciones son muy amplias, permitiendo el estudio de funciones, estructuras, parámetros homeostáticos, etc. La mayor parte de los fluorocromos desarrollados por las casas comerciales están dirigidas al estudio de diversas propiedades y estructuras de las células eucariotas. Por lo tanto, la adaptación de estas técnicas a células procariotas requiere de un estudio metodológico previo que permita adaptarlas a sus particularidades. Entre estas particularidades es destacable el menor tamaño, que siempre va a dificultar la detección de las células teñidas, y la presencia de diferentes envolturas celulares, aspecto que cobra especial importancia en el caso de los esporos bacterianos, que se consideran muy impermeables al acceso de ciertas moléculas.

Los fluorocromos empleados en esta tesis fueron yoduro de propidio (IP) y Syto 16. La tinción con yoduro de propidio es una técnica muy empleada en los estudios de integridad de la membrana citoplasmática de las células vegetativas de diversas especies

bacterianas. Dada la similitud entre dicha membrana y la membrana interna de los esporos, esta técnica también se emplea para estudiar el estado de esta envoltura en los esporos (Laflamme y col., 2004; Mathys y col., 2007). Cabe destacar que esta envoltura es la barrera de permeabilidad más importante que poseen los esporos, por lo que juega un papel muy importante en la resistencia a numerosos agentes capaces de dañar el DNA (Setlow, 2006, 2016). En cuanto al Syto 16, se trata de un colorante empleado en el estudio de la germinación de esporos, ya que es incapaz de atravesar el córtex cuando se encuentra intacto, mientras que tras la germinación y la hidrólisis de esta envoltura, el colorante entra al protoplasto del espora y se une al material genético, emitiendo fluorescencia (Tehri y col., 2018). De entre todos los fluorocromos empleados para el estudio de la germinación, se seleccionó el Syto 16 ya que se ha descrito que aporta la mayor diferencia en intensidad de tinción entre esporos latentes y germinados (Tehri y col., 2018).

Para la puesta a punto de las tinciones se empleó *B. subtilis*, ya que es un microorganismo para el cual existe más información previa en la literatura científica en relación a este tipo de técnicas. De manera rutinaria se utilizó un microscopio de contraste de fases, dotado de epifluorescencia, para poder observar las células individuales. Además, en los experimentos exploratorios más preliminares, se realizaron también lecturas en un fluorímetro, para obtener medidas de intensidad de fluorescencia, como se describe a continuación en este capítulo. El uso del citómetro de flujo disponible en nuestro laboratorio tuvo que desecharse por tener los esporos objeto de estudio un tamaño excesivamente pequeño para ser distinguidos con precisión, mediante el láser disponible en el equipo, como se ha descrito previamente con otros microorganismos de mayor tamaño (Marcén y col, 2017). Una vez establecidas las condiciones de tinción más adecuadas con *B. subtilis*, se realizaron las adaptaciones necesarias para poder utilizarlas en *G. stearothermophilus*, microorganismo que presentó dificultades adicionales.

4.1.2.1. Tinción con yoduro de propidio (IP)

Elección de los controles

Las condiciones de partida se eligieron conforme a lo descrito en la bibliografía (Loison y col., 2016): una concentración de IP 4 μM durante 15 minutos en oscuridad. En primer lugar era necesario determinar un control positivo adecuado, para, en una fase posterior, estudiar las condiciones de concentración y tiempo de contacto con el fluorocromo. Análogamente a los trabajos con células vegetativas, se exploró inicialmente la utilización de un control positivo consistente en esporos tratados térmicamente, en este caso mediante autoclavado (121°C/20 min). Los primeros resultados mostraron un bajo nivel de tinción en esporos autoclavados, por lo que se optó por utilizar esporos expuestos al etanol, a temperatura elevada, como control positivo de tinción (Loison et al, 2016). Inicialmente, fue necesario establecer las condiciones de tratamiento con etanol más adecuadas, es decir, aquellas condiciones en las que la mayor parte de los esporos presentaran daños en la membrana interna suficientes para permitir la entrada del yoduro de propidio.

En una primera aproximación se emplearon varias concentraciones de etanol y dos tiempos de tratamiento (15 y 60 min), a una temperatura de 70°C (Figura 4.1.6). Tras la incubación con el IP, las muestras fueron analizadas por fluorimetría. Como se puede apreciar en la figura, la intensidad de tinción aumentó con la concentración de etanol para los dos tiempos de tratamiento, hasta alcanzar un máximo a una concentración del 75%. Cuando los esporos fueron tratados con 100% etanol durante 60 minutos, la intensidad de tinción disminuyó.

Este tipo de comportamiento es frecuente ya que la intensidad de tinción con IP depende no solo de la integridad de la membrana, sino también de la conformación del material genético, DNA, que puede tener mayor o menor cantidad de puntos de unión en función del tratamiento aplicado. En nuestra opinión, estas condiciones quizá fueron demasiado severas pudiendo producir cambios conformacionales en el DNA de los esporos, por lo que quizá el colorante fue incapaz de unirse a él con la misma eficacia.

Por otro lado, se observó mayor fluorescencia cuando el tratamiento de etanol fue de 60 minutos, en comparación a 15 minutos, para prácticamente todas las concentraciones estudiadas. A partir de estos resultados se seleccionó la concentración de

75% de etanol y se decidió estudiar con mayor profundidad el efecto del tiempo de tratamiento. En este caso, además de las medidas fluorimétricas, intensidad de tinción, se determinó también el porcentaje de esporos teñidos mediante observación microscópica de células individuales (Figura 4.1.7).

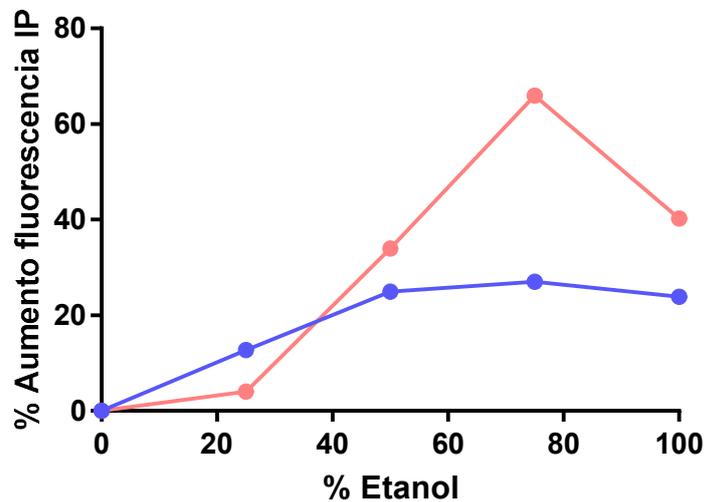


Figura 4.1.6. Evolución de la intensidad de tinción con IP de esporos de *B. subtilis* tratados con distintas concentraciones de etanol durante 15 minutos (azul) y 60 minutos (rojo).

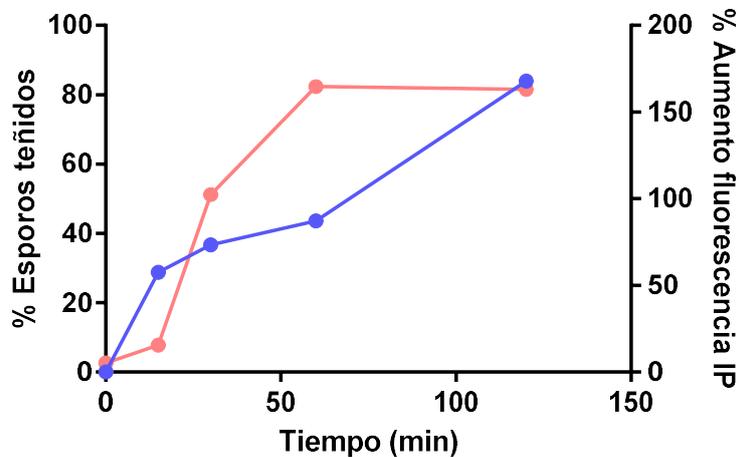


Figura 4.1.7. Efecto del tiempo de tratamiento con etanol en el aumento de fluorescencia (azul) y en el porcentaje de esporos teñidos (rojo).

Como se aprecia en la Figura 4.1.7, la intensidad de la fluorescencia fue mayor tras mayores tiempos de exposición a etanol. Sin embargo, el porcentaje de esporos teñidos fue similar tras 60 y 120 minutos de exposición a etanol. No se consiguió el 100%

de esporos teñidos, ni prolongando el tratamiento. Por ello, se seleccionó como tiempo de tratamiento 60 minutos.

Seguidamente se estudió el efecto de la temperatura de tratamiento con etanol en la intensidad de tinción y en el porcentaje de esporos teñidos (Figura 4.1.8), ya que la temperatura influye en la permeabilidad de la membrana interna (Loison y col., 2016). Como se puede observar en la figura, ambos parámetros fueron mayores cuando la temperatura de exposición a etanol era de 70°C, temperatura que seleccionamos como más adecuada para nuestro propósito.

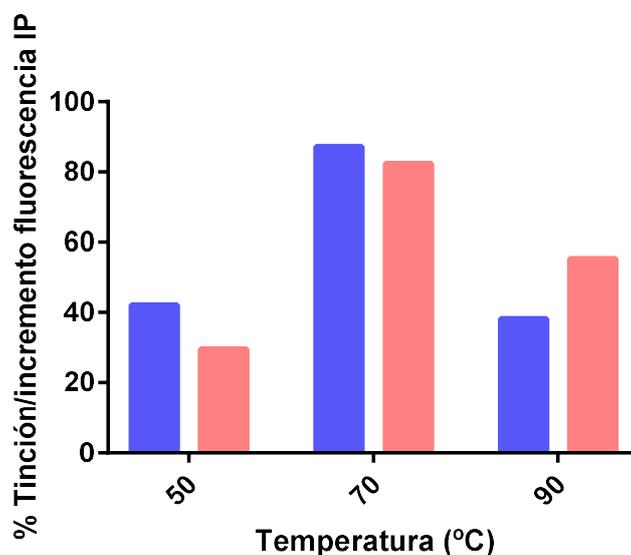


Figura 4.1.8. Efecto de la temperatura de tratamiento con etanol en la intensidad de fluorescencia (azul) y el porcentaje de esporos teñidos con IP (rojo).

En resumen, con estos resultados se establecieron las condiciones de tratamiento con etanol para los controles positivos de tinción de *B. subtilis* con IP: etanol 75% a 70°C, durante 60 minutos de tratamiento.

Optimización de la concentración y el tiempo de contacto

Seguidamente, se procedió a poner a punto las condiciones de tinción, con el objetivo de determinar aquellas condiciones que proporcionasen el mayor porcentaje de esporos teñidos en el control positivo y el menor porcentaje en el control negativo (esporos nativos no tratados), siempre con fluorescencias suficientemente intensas para

ser fácilmente distinguibles mediante observación microscópica. En primer lugar se estudiaron varias concentraciones de IP para un mismo tiempo de tinción (15 min) (Figura 4.1.9), abarcando concentraciones utilizadas en distintos trabajos científicos (Guidi-Rontani y col., 2001; Laflamme y col., 2004; Mathys y col., 2007; Reineke y col., 2013)

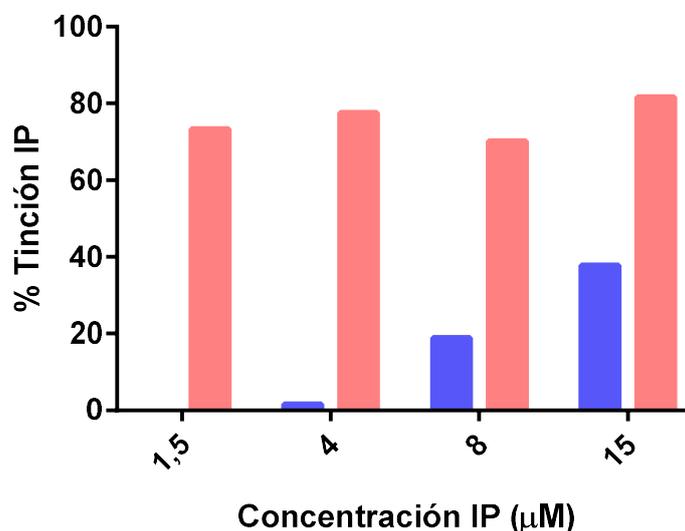


Figura 4.1.9. Efecto de la concentración de IP en el porcentaje de tinción de esporos de *B. subtilis* nativos (azul) y tratados con etanol 75%, 70°C durante 60 minutos (rojo).

En la Figura 4.1.9 se observa que todas las concentraciones utilizadas daban lugar a porcentajes de tinción similares, del 70-80%, de los esporos expuestos a etanol. Sin embargo, los esporos nativos se teñían progresivamente en mayor proporción al incrementarse la concentración de colorante. La tinción de los esporos nativos no es deseable, ya que impide distinguir los esporos que presentan una membrana interna dañada por efecto del tratamiento, en este caso de etanol. En la gráfica se puede observar que las concentraciones más adecuadas eran 1,5 y 4 μM , ya que proporcionaban el mayor porcentaje de tinción de los esporos tratados, sin que se apreciase apenas tinción en los esporos nativos. A pesar de que con la concentración de 1,5 μM no se observó tinción en los esporos nativos, la tinción en los esporos tratados fue muy débil, por lo que podría ocasionar dificultades en la interpretación de los resultados. En resumen, se decidió escoger una concentración de 4 μM para experimentos posteriores.

Una vez establecida la concentración de IP, 4 μM , se estudió el efecto del tiempo de tinción tanto en los esporos nativos como en los tratados con etanol (Figura 4.1.10).

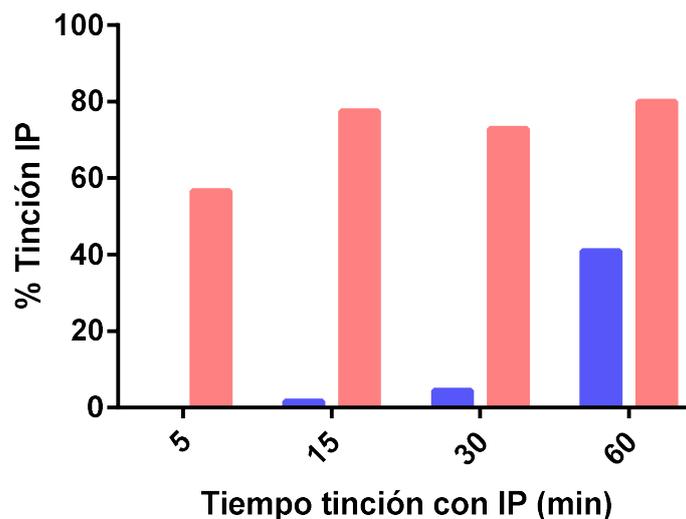


Figura 4.1.10. Efecto del tiempo de contacto con IP de esporos de *B. subtilis* nativos (azul) y tratados con etanol 75%, 70°C durante 60 minutos (rojo) en el porcentaje de tinción.

Como se puede apreciar en la Figura 4.1.10, el tiempo de contacto con IP más adecuado fueron 15 minutos, ya que en esas condiciones se obtenía el mayor porcentaje de tinción en los esporos tratados, sin que la tinción en los esporos nativos fuera muy elevada.

Por tanto, las condiciones seleccionadas de tinción con IP fueron 4 μ M durante 15 minutos.

Comprobaciones adicionales

Una vez seleccionadas las condiciones de tratamiento con etanol y las condiciones de tinción con IP, se comprobó con microscopía de fluorescencia la eficacia del tratamiento y de la tinción (Figura 4.1.11), y se realizaron réplicas.

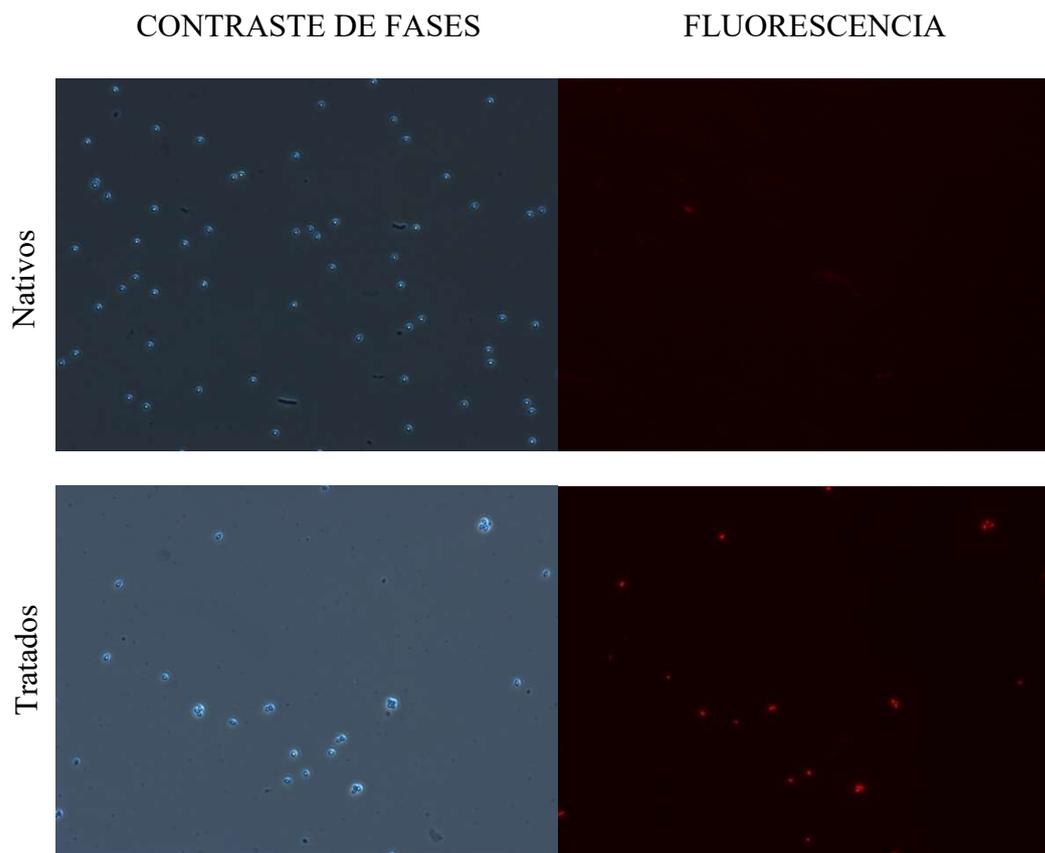


Figura 4.1.11. Fotografías obtenidas tras la observación en el microscopio de contraste de fases-epifluorescencia de esporos de *B. subtilis* nativos y tratados con etanol 75 % a 70°C durante 1 h y teñidos con ioduro de propidio (4 μ M/15min).

Como se puede observar en la Figura 4.1.11, los esporos nativos (C-) no mostraron tinción, mientras que los tratados con etanol sí que captaron el colorante y mostraron fluorescencia.

Además, se realizaron tres tratamientos independientes que arrojaron unos porcentajes de tinción de $70,15 \pm 10,89\%$.

4.1.2.2. Tinción con Syto 16

Elección de los controles

En este caso también se partió de condiciones de tinción seleccionadas de la bibliografía, 0,5 μ M durante 15 minutos de tinción en oscuridad (Mathys y col., 2007). Como control positivo se utilizaron esporos incubados en presencia de nutrientes capaces

de inducir la germinación de *B. subtilis*, inicialmente se utilizó DL-valina. Para establecer las condiciones del control positivo de Syto 16, se realizaron pruebas de incubación con este aminoácido, a 30°C. Durante la incubación, se extraían muestras que se sembraban en placa antes y después de ser tratadas térmicamente (75°C/10 min), para estimar el porcentaje de germinación por pérdida de termorresistencia (recuento diferencial antes de pasteurizar, tras pasteurizar AP/TP). De manera simultánea se teñían con Syto 16. La Figura 4.1.12 muestra el porcentaje de germinación estimado tras diferentes tiempos de contacto con el germinante y el porcentaje de esporos teñidos con Syto 16, estimados mediante observación en el microscopio de epifluorescencia.

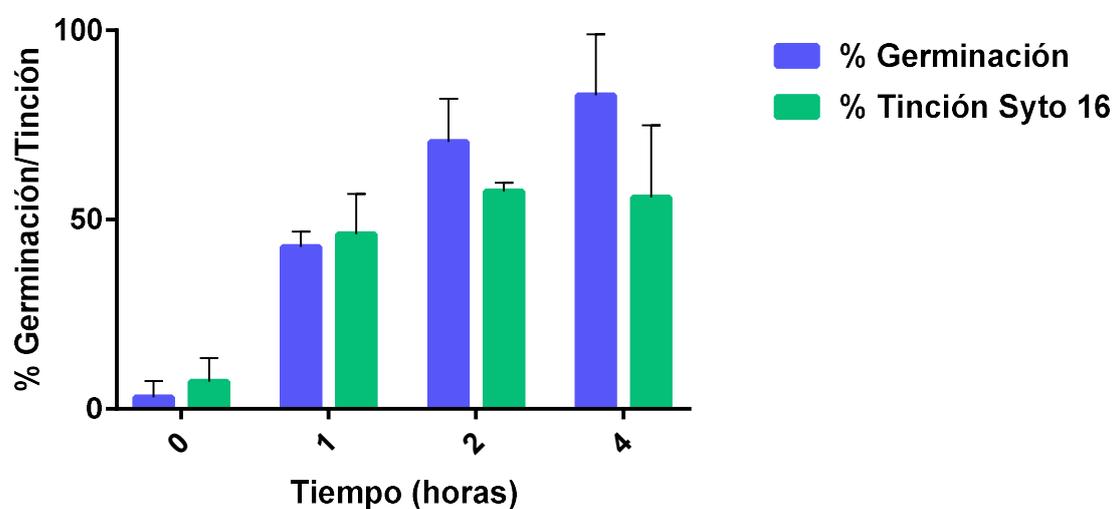


Figura 4.1.12. Relación entre el porcentaje de esporos de *B. subtilis* germinados (diferencia entre recuento antes y después de pasteurización) y el porcentaje de esporos teñidos con Syto 16 a varios tiempos de exposición a DL-valina a 30°C.

Como se aprecia en la Figura 4.1.12, tanto la germinación como la tinción con este colorante siguieron una tendencia ascendente con el tiempo de incubación en DL-valina. Esto confirmaría que el fluorocromo permitiría identificar esporos en los que está teniendo lugar la germinación. Sin embargo, a pesar de que la tendencia es similar, en términos absolutos, y aunque no se puede demostrar una diferencia estadísticamente significativa, el porcentaje de ambos fenómenos no coincide totalmente, de manera que la tinción con Syto 16 parece sufrir cierto retraso en el tiempo con respecto a la germinación, estimada mediante recuento diferencial en placa (AP/TP). Esta diferencia cuantitativa podría deberse a que el Syto 16 necesita más tiempo para ser capaz de entrar

hasta el protoplasto, mientras que la pérdida de termorresistencia podría ser un evento inicial en la germinación, que precedería a la hidrólisis del córtex. Es decir, muy probablemente la tinción con Syto 16 es indicativo de una germinación en fase más avanzada. En cualquier caso, los resultados sugerían que podíamos emplear la germinación con nutrientes para poner a punto la tinción con Syto 16 en *B. subtilis*. Con objeto de poder utilizar esta técnica con otros microorganismos, decidimos emplear caldo nutritivo suplementado con extracto de levadura (0,6 %), por ser un medio complejo que podría desencadenar la germinación en la mayor parte de la población y en la mayor parte de géneros y especies.

Optimización de la concentración y el tiempo de contacto

Al igual que en el caso del IP, para establecer las condiciones de tinción más adecuadas con Syto 16, en primer lugar se estudió el efecto de la concentración de colorante en el porcentaje de esporos teñidos, utilizando esporos de *B. subtilis* nativos (control negativo) y esporos incubados en caldo nutritivo suplementado con extracto de levadura durante 2 horas (control positivo) (Figura 4.1.13).

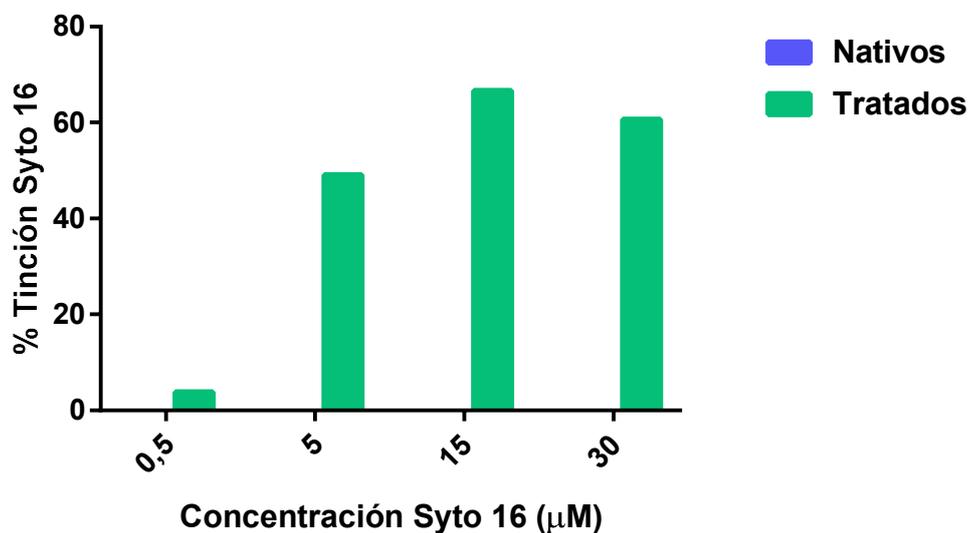


Figura 4.1.13. Efecto de la concentración de Syto 16 (15 min) en el porcentaje de tinción de esporos de *B. subtilis* nativos (azul) e incubados en caldo nutritivo con extracto de levadura durante dos horas (verde).

Cabe destacar que con este colorante no se apreció tinción en los esporos nativos para ninguna concentración de colorante probada. En los esporos germinados, se observó un aumento del porcentaje de tinción al incrementarse la concentración del colorante, si bien a la mayor concentración utilizada, 30 μM , comenzaba a disminuir el porcentaje de tinción. Con los resultados obtenidos seleccionamos la concentración de 15 μM , por ser la que mayor porcentaje de tinción mostró en los esporos germinados.

Posteriormente, se probaron varios tiempos de exposición de los esporos al colorante para establecer el más adecuado (Figura 4.1.14).

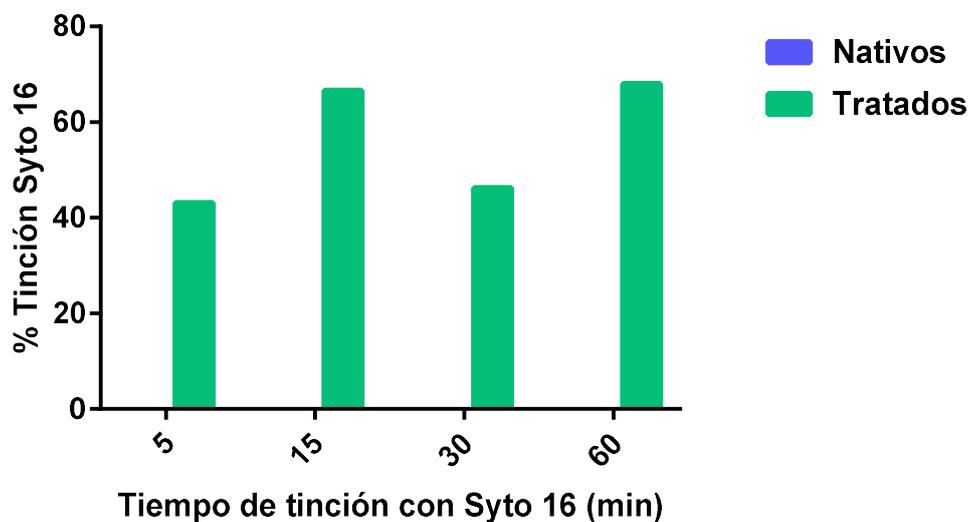


Figura 4.1.14. Efecto del tiempo de tinción con Syto 16 (15 μM) en esporos de *B. subtilis* nativos (azul) e incubados en caldo nutritivo con extracto de levadura (verde).

Como se puede apreciar en la Figura 4.1.14, en ningún caso se observó tinción en los esporos nativos. Por lo que respecta a los esporos germinados, no se observaba una tendencia clara respecto al tiempo de exposición al colorante. Por tanto, el tiempo de contacto con Syto 16 escogido fue 15 minutos, por ser el mismo que para yoduro de propidio, lo que facilitaría los experimentos posteriores.

CONTRASTE DE FASES

FLUORESCENCIA

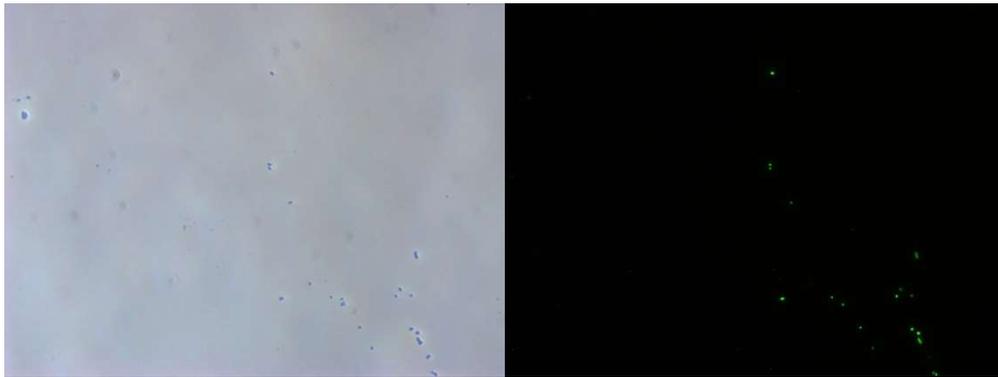


Figura 4.1.15. Fotografías obtenidas tras la observación en el microscopio de contraste de fases-epifluorescencia de esporos de *B. subtilis* germinados en caldo nutritivo con extracto de levadura y teñidos con Syto 16 ($15 \mu\text{M}/15\text{min}$).

4.1.2.3. Tinción doble (IP – Syto 16)

Una vez determinadas las condiciones de tinción para cada colorante, se comprobó si era factible realizar una tinción doble, con los dos colorantes añadidos simultáneamente. La distancia entre sus espectros de emisión permitiría evaluar si un espora se tiñe con uno solo de los colorantes o con los dos a la vez, como se ha descrito ocasionalmente en la bibliografía. Para ello se utilizaron esporos germinados mediante exposición a nutrientes, y se procedió a realizar una tinción con cada uno de los colorantes de manera individual, y también una tinción simultánea con ambos. Posteriormente, se determinó el porcentaje de esporos teñidos en los tres casos. Los resultados se muestran en la Figura 4.1.16.

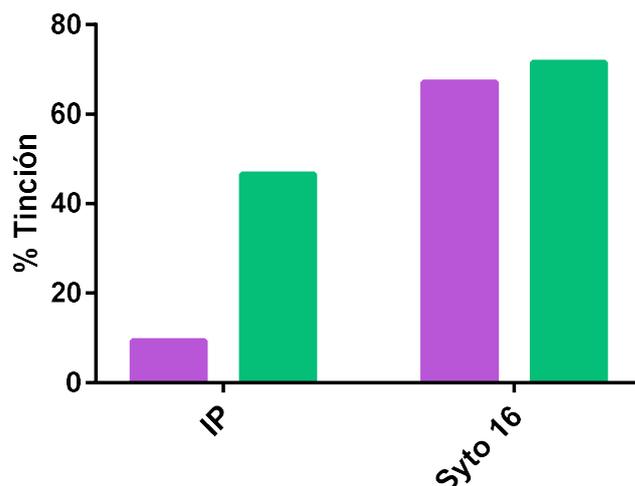


Figura 4.1.16. Porcentajes de tinción con IP y Syto 16, incubando esporos de *B. subtilis* germinados con nutrientes, con los dos colorantes juntos (morado) y por separado (verde).

Como se puede observar en la Figura, el porcentaje de tinción con IP disminuía notablemente cuando se utilizaba la tinción doble. Estos resultados indicaban que muy probablemente se producía una competición entre ambos colorantes por los puntos de unión al ADN, predominando la unión del Syto 16 frente al IP, lo cual, al menos en las condiciones exploradas en este trabajo, no permitiría el uso simultáneo de ambos.

4.1.2.4. Adaptaciones de los protocolos para *G. stearothermophilus*.

Una vez establecidas las condiciones de tinción en *B. subtilis*, se procedió a adaptarlas a *G. stearothermophilus*. Este microorganismo presenta dificultades adicionales para su tinción, y de hecho existen muy escasas publicaciones científicas en las cuales se utilice este tipo de técnicas.

En primer lugar, se procedió a establecer un control positivo de tinción con IP. Para ello se estudiaron las condiciones de tratamiento con etanol más adecuadas para este microorganismo, utilizando las condiciones de tinción con IP (4 μ M, 15 min) y de exposición al etanol seleccionadas para *B. subtilis* (75%, 70°C, 1 h). Se exploraron además condiciones experimentales de mayor concentración y tiempo, en previsión de la mayor dificultad de permeabilización de la membrana de *G. stearothermophilus*. Los

resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.1.17, en la cual se incluyen los porcentajes de tinción con IP determinados mediante microscopía de epifluorescencia.

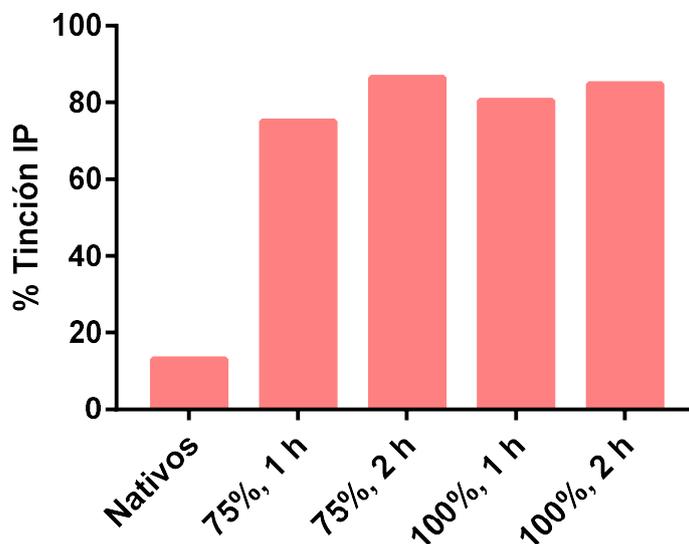


Figura 4.1.17. Efecto de distintas condiciones de tratamiento con etanol en el porcentaje de tinción con IP en *G. stearothermophilus*.

Se seleccionaron las condiciones de 75% de etanol durante 2 horas, por ser aquellas que proporcionaron un número superior de esporos teñidos, aunque los porcentajes de tinción fueron similares en todos los casos. Es destacable que en este caso se observó un porcentaje de tinción de los esporos nativos superior al que se obtenía con *B. subtilis*, y superior al deseable ($\geq 10\%$), lo cual nos obligó a reevaluar las condiciones de tinción (concentración colorante/tiempo de contacto), como se describe a continuación.

Una vez seleccionadas las condiciones de tratamiento con etanol, se procedió a optimizar las condiciones de tinción. Para ello, se utilizaron varias concentraciones de IP (Figura 4.1.18).

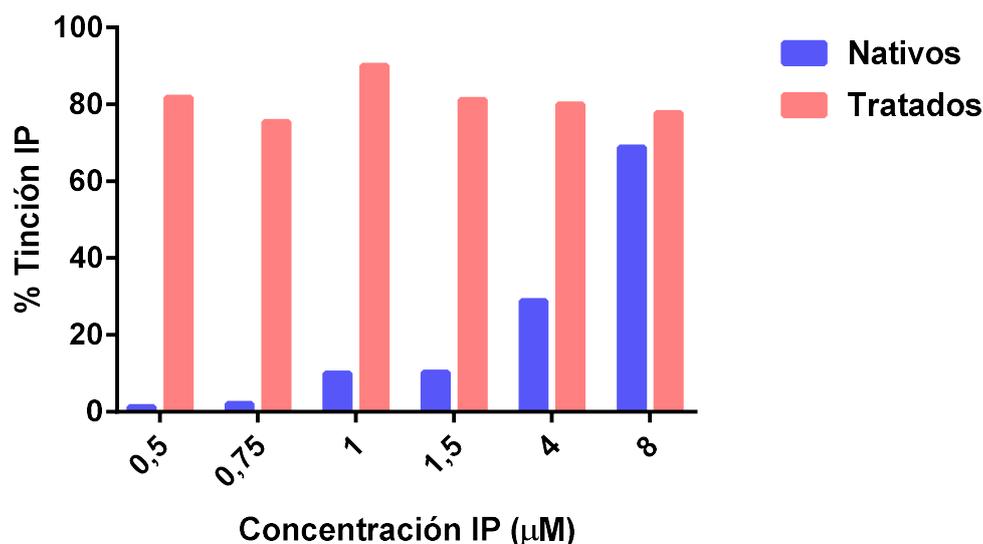


Figura 4.1.18. Efecto de la concentración de IP (15 min) en el porcentaje de tinción de esporos de *G. stearothermophilus* nativos (azul) y tratados con etanol 75%, 70°C durante dos horas (rojo).

Como muestra la Figura, al incrementarse la concentración de IP se producía un aumento de la tinción de los esporos nativos. Este aumento era de gran magnitud, muy superior la observada en *B. subtilis*, y dificultaba la utilización de concentraciones de IP superiores a 1,5 mM. Por ejemplo, con la concentración 8 μM no se podría distinguir una población de esporos nativos de una tratada con etanol.

Con los datos obtenidos, se decidió seleccionar 1 μM de IP para las tinciones de este microorganismo. A pesar de que concentraciones inferiores de IP producían porcentajes de tinción menores en los esporos nativos, la tinción observada en los esporos tratados era demasiado débil, lo que podría conducir a errores de interpretación en los experimentos. Por tanto, las condiciones de tinción seleccionadas fueron 1 μM de IP, durante 15 minutos, asumiendo un porcentaje de tinción de esporos nativos de alrededor del 10%.

En cuanto a la tinción con Syto 16, *G. stearothermophilus* presentaba la dificultad adicional de su elevada proporción de esporos superlatentes. Es decir, la mayor parte de los esporos son incapaces de germinar en presencia de nutrientes, por lo que para poner a punto esta técnica, no se pudieron utilizar las mismas condiciones que en el caso de *B. subtilis*.

En primer lugar, se estudió el efecto de dipicolinato cálcico (Ca-DPA) en la tinción con Syto 16 (Figura 4.1.19), utilizando las condiciones de tinción establecidas con *B. subtilis* (15 μ M, 15 min).

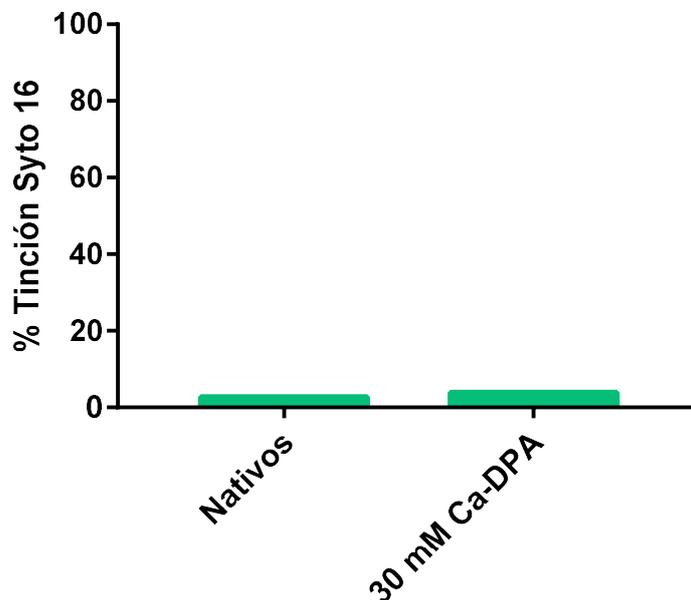


Figura 4.1.19. Efecto de varios tratamientos en el porcentaje de tinción con Syto 16 de esporos de *G. stearothermophilus*.

Según se aprecia en la Figura 4.1.19, con el tratamiento aplicado no se consiguió obtener un porcentaje de tinción superior al 5%, a pesar de que se consiguió activar parte de los esporos superlatentes (0,5 ciclos log). Por ello, nos planteamos la posibilidad de que los tratamientos podían poner en disposición de germinar los esporos superlatentes, pero no producían su germinación directa. Para comprobar este aspecto, se aplicó un tratamiento con Ca-DPA y posteriormente, tras centrifugar para retirar el compuesto, se resuspendieron los esporos en caldo nutritivo con extracto de levadura a 55°C. Se fueron tomando muestras a lo largo del tiempo de incubación en caldo nutritivo, que se fueron tiñendo con Syto 16.

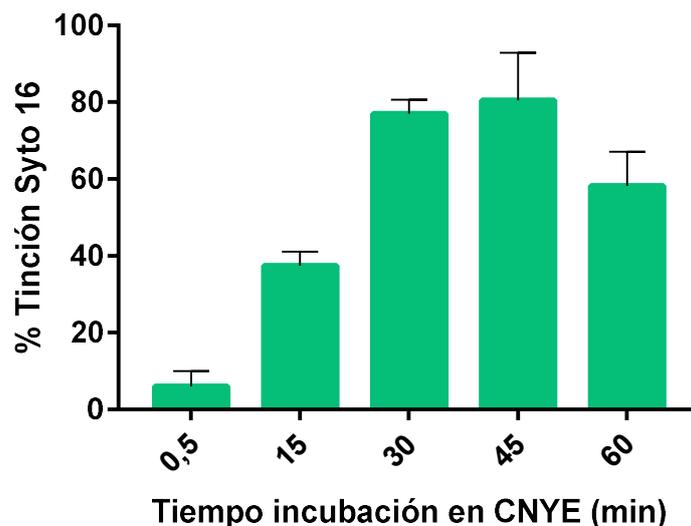


Figura 4.1.20. Efecto del tiempo de incubación en caldo nutritivo con extracto de levadura (CNYE) de esporos de *G. stearothermophilus* tratados con Ca-DPA en la tinción con Syto 16.

Como se aprecia en la Figura, en este caso, el porcentaje de tinción que se obtuvo fue alrededor del 80%, tras la exposición a CaDPA y 45 minutos de incubación en CNYE. Tiempos de incubación más prolongados producían un descenso en el porcentaje de tinción, probablemente debido a cambios adicionales en los esporos, como por ejemplo en la conformación del ADN. Probablemente estos cambios impidan obtener porcentajes de tinción cercanos al 100%. Por tanto, las condiciones seleccionadas fueron 45 minutos de exposición al caldo nutritivo; en estas condiciones el porcentaje de germinación, calculado a partir de la diferencia de recuentos entre antes y después de pasteurizar, fue $90,59 \pm 1,47\%$.

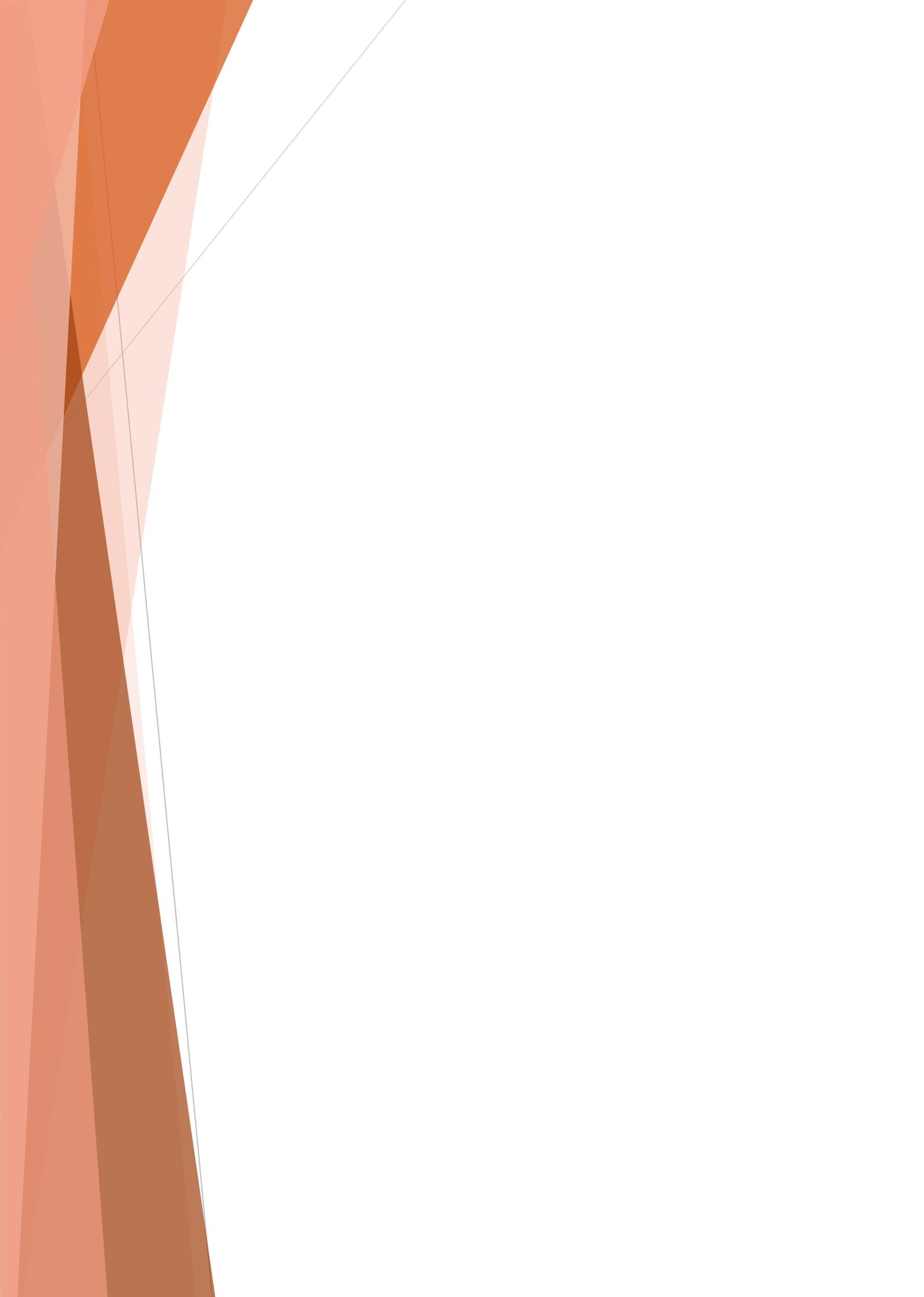
Hay que tener en cuenta, que estos datos en esta especie microbiana son de difícil interpretación debido al solapamiento de los fenómenos fisiológicos de activación y de germinación e incluso de cambios estructurales celulares. Por ejemplo, tiempos de incubación más prolongados producían un descenso en el porcentaje de tinción, probablemente debido a cambios adicionales en los esporos, como puede ser en la conformación del ADN. Probablemente estos cambios impidan obtener porcentajes de tinción cercanos al 100%.

Las condiciones de tinción establecidas permitían obtener un bajo porcentaje de tinción de los esporos nativos, y un elevado porcentaje de tinción de los germinados

mediante el tratamiento secuencial CaDPA+nutrientes, por lo que no se consideró necesario reevaluar el binomio concentración/tiempo de tinción.

En resumen, se establecieron unos protocolos de tinción que permitían evaluar la integridad de la membrana interna de los esporos (tinción con IP), y la hidrólisis del córtex/germinación en fase avanzada (tinción con Syto 16). Debido a las limitaciones de las técnicas aquí descritas, muy posiblemente relacionadas con la particular fisiología de los esporos bacterianos, los datos obtenidos permitirán observar tendencias en los dos fenómenos estudiados, cuando las poblaciones de esporos se someten a tratamientos tecnológicos. Resulta muy difícil hacer una correlación directa entre el porcentaje de tinción y una observación celular determinada, ya que en ningún caso se consiguen porcentajes de tinción cercanos al 100%, al contrario de lo que ocurre con las poblaciones de bacterias vegetativas (Marcén, 2018; Marcen y col., 2017).

4.2. Cinéticas de inactivación y cálculo de tratamientos de esterilización



Según se indicó en la introducción, los tratamientos industriales de esterilización se realizan actualmente asumiendo una cinética de inactivación estrictamente exponencial. Sin embargo, en muchas ocasiones aparecen hombros que pueden inducir errores de 10 veces, e incluso más, en los cálculos de probabilidades de supervivencia.

Se han desarrollado modelos para describir esta desviación de la linealidad, pero son descriptivos y, por tanto, de escasa utilidad para hacer cálculos de esterilización en condiciones industriales; en definitiva, actualmente sabemos que pueden aparecer hombros, pero no podemos prever su duración en diferentes condiciones de tratamiento.

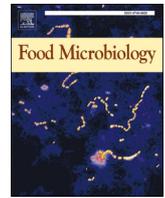
Es claro que los tiempos de esterilización calculados por el método de las gráficas de supervivencia o del punto final pueden diferir ampliamente, pero no lo es tanto en el efecto en los valores z estimados a partir de las líneas de tiempos de reducción decimal y de las líneas TDT; de hecho Condón-Abanto y col. (2016) encontraron que ambas líneas eran paralelas y por tanto, los valores estimados iguales. Este paralelismo refleja que debe existir una relación entre la duración de los hombros y los valores D_t ; esta es nuestra hipótesis de trabajo.

Esta parte de nuestra investigación se inició con el objetivo de verificar y cuantificar esta relación y, de ser posible, desarrollar un modelo predictivo sencillo que permita calcular con mayor precisión los tiempos de esterilización.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fm

Impact of shoulders on the calculus of heat sterilization treatments with different bacterial spores

V. Ruiz^a, R. Alonso^a, M. Salvador^a, S. Condón^a, S. Condón-Abanto^{b,*}

^a Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Tecnología de los alimentos, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (Universidad de Zaragoza-CITA), Zaragoza, Spain

^b R&D Department, Unidad Técnica, New Strategies and Food Preservation Techniques Area, Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria (CNTA), San Adrián, Navarra, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Survival curves
Heat resistance
Spore inactivation
Inactivation kinetics

ABSTRACT

To date, heat is still the most used technology in food preservation. The calculus of heat treatments is usually based on Bigelow observations i.e. treatment time is an exponential function of the heat treatment temperature. However, a number of researchers have reported deviations from linearity in heat inactivation curves that caused errors in the calculus. This research was designed to evaluate the variability of shoulder length among different sporulated species, the impact of treatment temperature on these shoulders and the relationship between the traditional D_T value and shoulder length. The heat inactivation kinetics of five bacterial spores of importance for the food industry was evaluated. *B. weihenstephanensis* and *B. cereus* did not show shoulders and D_T values calculated ranged from 0.99 to 0.23 and from 1.33 to 0.56 respectively at temperatures from 100 to 102.5 °C. On the other side *B. subtilis*, *B. licheniformis* and *G. stearothermophilus* showed shoulders of 1.75–0.42, 1.92–0.43 and 3.22–0.78 and D_T values of 1.52–0.32, 2.12–0.59 and 2.22–0.48 respectively in the range of temperatures tested. From the results obtained it was concluded that the presence and magnitude of shoulders depended on the bacterial spore species, the longest being those on the bacterial spores which showed greatest heat resistance. It has also been proved that shoulder lengths vary with treatment temperature in the same proportion of traditional D_T values, with the relationship Sl/D_T being constant. Thus, an equation which included the constant Sl/D_T was proposed.

1. Introducción

Heat treatment is still the most used preservative technology for ensuring food safety and extends shelf-life of food stuffs. Despite the efforts to find new technologies with less impact on food properties, heat is still considered to be the most efficient technology due to the reduced lethality of non-thermal technologies in bacterial spore inactivation (Iciek et al., 2006). Due to market globalization, extended shelf-life for foods is required and heat is the only technology currently available for ensuring food safety and stability during the shelf-life period.

Spores of *Bacillus* species have been involved in food spoilage and food-borne disease (Ramirez-Peralta et al., 2012) so they must be inactivated in products in which they can germinate and grow. Bacterial spores are characterized as being non-metabolic and for their high resistance to food preservation treatments. Additionally, spores can remain dormant and then return to a vegetative form through

germination and outgrowth (Paidhungat and Setlow, 2002).

In 1921 Bigelow (1921) observed that the time required for inactivating a population of spores at a constant temperature was an exponential function of the treatment temperature. When the logarithm of the required sterilization time was represented versus treatment temperature, a straight line was obtained. This line was named the thermal dead time curve (TDT). A year later Esty and Meyer (1922) also observed that the number of survivors of a population treated at a constant temperature was an exponential function of treatment time. When the logarithm of the fraction of survivors was represented versus treatment time, a straight line was obtained (survival curve). These observations demonstrated that sterilization times could be calculated mathematically, which paved the way for both thermobacteriology and predictive microbiology.

At first, sterilization times were calculated by the end point method which consisted in treating a bacterial population at different

* Corresponding author.

E-mail address: scondon@cнта.es (S. Condón-Abanto).

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103663>

Received 6 August 2020; Received in revised form 9 October 2020; Accepted 9 October 2020

Available online 17 October 2020

0740-0020/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

temperatures for different times until the product became stable during subsequent incubation. Then, by representing the required times for stability versus treatment temperatures, TDT lines could be obtained which could be expressed as equation (1).

$$z = \frac{T_2 - T_1}{\text{Log } F_{T1} - \text{Log } F_{T2}} \quad (\text{Eq. 1})$$

Where z represents the negative inverse of the slope of the TDT line (i.e. degrees by which treatment temperature must increase in order to reduce the sterilization time ten-fold), T_1 and T_2 are two different treatment temperatures and F_{T1} and F_{T2} the required sterilization times at those temperatures. This equation would allow sterilization times to be calculated at either treatment temperature.

Some years later Katzin et al. (1943) developed the concept of decimal reduction time (D_T) which was defined as the time required to inactivate the 90% of the bacterial population at a constant treatment temperature. Using this parameter, sterilization time could be calculated using equation (2).

$$F_T = D_T \times (\text{Log}N_0 - \text{Log}N_t) \quad (\text{Eq. 2})$$

Where F_T is sterilization time, D_T is decimal reduction time, N_0 initial concentration of the target microorganism and N_t microbial survival probability. In other words, the sterilization time would be the decimal reduction time multiplied by the decimal reductions required.

The main advantage of equation (2) is that, from the tables of D_T and z values, calculus of treatment time at either temperature is very simple for inactivating a defined target. Following this model, the concept of F_0 ($=F_{121}$) sterilization, the aim of which was to guarantee 12 log reductions of *C. botulinum* (i.e. 12D), was developed. Currently, this model is still used. For example, the concept of 5D (i.e. 5 log reductions of the most pertinent microorganism) is widely accepted in juice pasteurization (FDA, 2001). However, the accuracy of this model is directly dependent on the fact that microbial inactivation follows first order kinetics.

In recent decades, thousands of survival curves have been published. These data have demonstrated that deviations from linearity in microbial inactivation kinetics exist. One such deviation is the shoulder phenomenon which is observed at the start of heat treatments where the microbial inactivation rate, if there is one, is lower than those reached in the exponential dead phase. Recently, a number of different models for describing these deviations, such as Weibull-like models, have been developed (Cebrián et al., 2017). However, these methods are descriptive but not predictive. In 2000, Geeraerd et al., incorporated into a model the parameter shoulder length (Sl), which is defined as the time preceding exponential decay in a survival curve. Considering this parameter, total treatment time would be calculated using equation (3).

$$F_T = D_T(\text{Log}N_0 - \text{Log}N_t) + Sl \quad (\text{Eq. 3})$$

Equation (3) is only descriptive because there is no data which shows how the Sl parameter changes with treatment conditions. While there is a large amount of data about D_T and z values for a variety of microbial species in different conditions, there are few quantitative data on shoulders. This is probably because in most methods for determining the thermal resistance of microorganisms there was a lag phase at heating which hindered accurate determination of this parameter. Additionally, simple models for calculating the Sl from the survival curves did not exist. However, currently these two challenges have been met.

This research was designed to answer the following questions: (1) by how much does the shoulder length on the survival curves of different aerobic mesophilic spore forming bacteria vary?, (2) Is there any relationship between shoulder length and treatment temperature? (3) Is there any relationship between the D_T and Sl values? and, could equation (3) be enhanced by using these relationships?

2. Material and methods

2.1. Spore suspensions preparation

In this research, one strain of *B. cereus* (STCC 148), *B. subtilis* (STCC 4522), *B. licheniformis* (STCC 4523) and *G. stearothermophilus* (STCC 4517) were obtained from the Spanish Type Culture Collection (STCC). The *B. weihenstephanensis* strain (n° 108) was kindly provided by the group of Prof. Lyng ("School of Agriculture and Food Science, University College Dublin).

The sporulation medium employed was nutrient agar (Oxoid, Basingstoke, UK) with 0.6% yeast extract (Oxoid) (NAYE) with 3 ppm (w/v) of manganese sulphate (Carlo Erba, Milan, Italy) added. Incubation temperatures were: 25 °C for *B. weihenstephanensis*, 30 °C for *B. cereus* and *B. subtilis*, 37 °C for *B. licheniformis*, and 55 °C for *G. stearothermophilus*. Spores were harvested after 72 h of incubation for *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* and *G. stearothermophilus* and after 10 days for *B. weihenstephanensis*. The spores were collected in a pH 7 McIlvaine buffer and centrifuged at 4000 rpm (Jouan centrifuge, CR 4.11, Saint-Herblain, France) during 20 min and re-suspended in a new buffer for cleaning. This process was repeated four times. Finally spore suspensions were pasteurized (80 °C for 5 min) to inactivate the remaining vegetative cells, and stored at 4 °C until a maximum of 4 months.

2.2. Heat treatments

Heat treatments were carried out in a MTS resistometer built at the University of Zaragoza and described by Raso et al., (1998). In short, this device consists in the main 700 ml stainless steel vessel inside of which is a 23 ml stainless steel treatment chamber. The main vessel contains the heating medium and is equipped with an electric heater and a refrigeration coil to maintain a constant temperature during treatment; an agitation device to ensure uniform temperature distribution and improve heat exchange with the treatment chamber; and valves/ports for pressurising the vessel, inserting a thermocouple, and inoculating and sampling. The treatment chamber is equipped with tow valves by which the exchange with the main vessel takes place. These valves enable the treatment medium to be pressurized and replaced after extracting the sample in the treatment chamber. This device have the advantage of working without a "lag" in the heating steps, which is especially useful for studying phenomena that occurs during the first moments of treatment.

Trials were carried out using McIlvaine citrate-phosphate buffers of pH 7 (Dawson et al., 1974) as treatment media. The device was filled with the treatment medium and switched on. When the desired temperature was reached (± 0.1 °C), 0.2 ml of the spore suspension was injected into the treatment chamber. After injection, 0.1 mL samples were collected at pre-selected times, diluted in pH 7 McIlvaine citrate-phosphate buffer and pour-plated in NAYE. All experiments were performed at least in triplicate on different working days.

2.3. Recovery and survival counting of treated spores

Samples plated in NAYE were incubated at 25 °C (*B. weihenstephanensis*), 30 °C (*B. cereus* and *B. subtilis*), 37 °C (*B. licheniformis*) and 55 °C (*G. stearothermophilus*) for 24 h or 48 h (*B. weihenstephanensis*) in aerobic conditions. Longer incubation times did not change the profile of the survival curves. Plate counting was carried out using an improved automatic colony counting image analyzer (Protos, Synoptics, Cambridge, UK) as previously described (Condon et al., 1987).

2.4. Data analysis

Survival curves were built representing the fraction of survivors ($\text{Log } N_t/N_0$) vs treatment time (min). Experimental data were fitted with the

Geeraerd et al. (2000) equation (equation (4)) using the GInaFIT Excel tool (Geeraerd et al., 2005).

$$N_t = N_0 \times e^{-k_{max} \times t} \left(\frac{e^{-k_{max} \times SI}}{1 + (e^{k_{max} \times SI} - 1)e^{-k_{max} \times t}} \right) \quad (\text{Eq. 4})$$

This equation describes survival curves with two parameters: shoulder length (SI) and inactivation rate (K_{max}). SI is the time needed to reach the exponential inactivation rate and K_{max} is the slope of the exponential section of the survival curve. In the equation N_t represents the microbial count at time t , N_0 the initial count and the treatment time in minutes. The traditional decimal reduction time value (D_T) can be calculated from K_{max} with equation (5).

$$D_T = \frac{2.303}{K_{max}} \quad (\text{Eq. 5})$$

In order to compare the heat resistance of several species, both D_T and SI values have been considered. For this reason, $4D_T$ values (also provided by the GInaFIT tool) were used. The $4D_T$ value could be defined as the required treatment time to inactivate 99.99% of the initial population. Mathematically, this parameter could be calculated as the sum of SI plus D_T value multiply by 4 (equation (6)).

$$4D_T = SI + (4 \times D_T) \quad (\text{Eq. 6})$$

Additionally, in order to quantify the thermal-dependence of the shoulder length, the z - SI value, previously described by Condon-Abanto et al. (2016) was also calculated. The z - SI value was defined as being the required rise in treatment temperature for reducing the SI 10-fold.

For the statistical analysis, the student's t -test and a one-way ANOVA were performed using the GraphPad PRISM 5 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA), and differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results and discussion

Currently, decimal reduction times, their relationship with treatment temperature and the physicochemical characteristics of the food matrixes of the most frequent aerobic spore-forming bacteria are known. However, shoulders on the survival curves have been detected relatively frequently. These deviations from linearity might induce errors in the calculus of sterilization times using the traditional method (i.e. assuming first order kinetics for inactivating the target microorganism).

To the best of the author's knowledge, to date, no research which enables shoulder length and the effects of influencing factors to be predicted is currently available. This might be due to the use of inadequate heat resistance determination methods for this purpose, or unreliable methods for accurately determining shoulder length. However, now both these problems have been solved. This research was designed to evaluate shoulder length using a mixing method (Davies, 1975), which omits the lag phase in heating (MTS resistometer), and uses the Geeraerd' equation which enables shoulder length to be accurately determined.

3.1. Heat inactivation kinetics for different bacterial spores

Traditionally, mathematical models have been developed for predicting bacterial inactivation by heat and thus ensuring food safety margins. In this research, the thermal inactivation kinetics for five spore-forming bacteria of interest in the food industry was evaluated. To give an example, Fig. 1 shows the survival curves for *B. weihenstephanensis*, *B. cereus*, *B. subtilis* and *B. licheniformis* at 100 °C and *G. stearothermophilus* at 116 °C in a pH 7 McIlvaine citrate-phosphate buffer. The figure, also includes the fitting line with Geeraerd' equation. As observed in Fig. 1, different profiles with deviations from first order kinetics appeared at the beginning of the survival curves for the different bacterial spores. While the survival curves for *B. cereus* and *B. weihenstephanensis* did not show significant deviations from linearity,

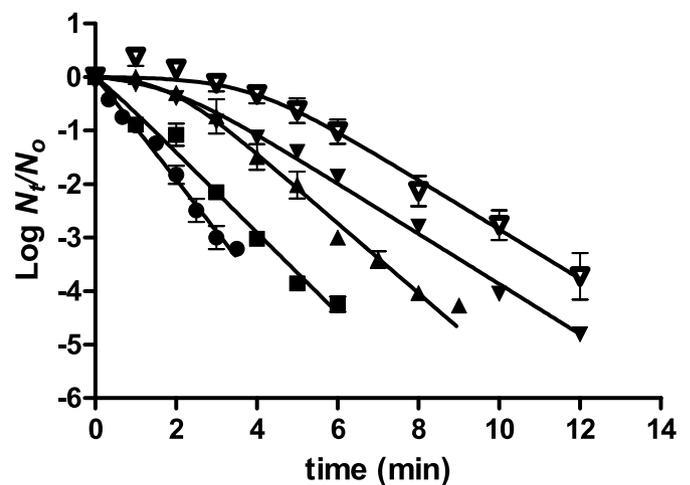


Fig. 1. Survival curves for *B. weihenstephanensis* (●), *B. cereus* (■), *B. subtilis* (▲), *B. licheniformis* (▼) at 100 °C and *G. stearothermophilus* (▽) at 116 °C in a pH 7 McIlvaine citrate phosphate buffer.

those for *B. subtilis*, *B. licheniformis* and *G. stearothermophilus* did in the first moments of treatment (shoulders).

Table 1 includes the thermal resistance parameters (decimal reduction time, shoulder length and $4D_T$ values) obtained from fitting the survival curves at different temperatures for the five bacterial spores under observation. Table 1 also includes the determination coefficient (R^2) and the root mean square error ($RMSE$) to show the goodness of fits. As observed in the table, the presence of shoulders on the survival curves for *B. weihenstephanensis* and *B. cereus* randomly changed with treatment

Table 1

Heat resistance parameters in pH 7 McIlvaine citrate phosphate buffer for the five sporulated species under observation at different temperatures.

Microorganism	T	SI mean (SD)	D mean (SD)	4D mean (SD)	R ²	RMSE
<i>B. weihenstephanensis</i>	100	0.20 (0.01)	0.99 (0.06)	4.16 (0.24)	0.99	0.11
	102.5	0.15 (0.04)	0.46 (0.01)	1.99 (0.07)	0.99	0.15
	105	0.17 (0.06)	0.23 (0.02)	1.09 (0.07)	0.99	0.08
<i>B. cereus</i>	100	0.19 (0.12)	1.33 (0.04)	5.51 (0.13)	0.98	0.21
	102.5	0.12 (0.12)	0.74 (0.03)	3.08 (0.03)	0.99	0.14
	105	0 (0.11)	0.56 (0.03)	2.00 (0.05)	0.98	0.39
<i>B. subtilis</i>	100	1.75 (0.35)	1.52 (0.04)	7.83 (0.22)	0.99	0.08
	102.5	0.72 (0.08)	0.77 (0.01)	3.80 (0.05)	0.98	0.23
	105	0.42 (0.06)	0.32 (0.01)	1.70 (0.03)	0.99	0.19
<i>B. licheniformis</i>	100	1.92 (0.04)	2.12 (0.03)	10.40 (0.16)	0.99	0.15
	102.5	1.15 (0.08)	1.03 (0.03)	5.27 (0.07)	0.99	0.08
	105	0.43 (0.22)	0.59 (0.10)	2.79 (0.19)	0.98	0.18
<i>G. stearothermophilus</i>	116	3.22 (0.27)	2.22 (0.09)	12.10 (0.47)	0.98	0.16
	119	0.95 (0.05)	0.74 (0.08)	3.91 (0.36)	0.98	0.11
	121	0.78 (0.01)	0.48 (0.01)	2.70 (0.04)	0.99	0.07

T, treatment temperature (°C); SI, shoulder length (min); D, decimal reduction time (min); 4D, time for a 4-log spore reduction (min); R², determination coefficient; RMSE, root mean square error; SD, standard deviation.

temperatures, and their duration were usually depreciable. Conversely, for the other three bacterial spores, shoulders were detected at all the temperatures tested and were greatest in those which showed the largest D_T values.

For *B. weihenstephanensis* the observed D_T values ranging from 0.99 to 0.23 while SI values were around 0.15 min at all temperatures tested. These D_T values were lower than those reported by Condon-Abanto et al. (2016) which were from 1.82 to 0.2 min at temperatures ranging from 102.5 to 110 °C in a buffer with a pH of 6.8 these difference among different researches might have been due to the different sporulation or treatment conditions used. Either way these authors also reported deviations from linearity for this bacterial spore specie. For *B. cereus*, the D_T values observed ranged from 0.56 to 1.33 min while the SI values obtained ranged from -0.24 to 0.19 min. The absence of significant shoulders and the magnitude of the D_T values calculated for *B. cereus* in this research are in accordance with those reported by other authors (Gaillard et al., 1998; Membré et al., 2006; Sarras et al., 2002; Tatsinkou Fossi et al., 2017). However, other authors have also reported deviations from linearity (both shoulders and tails) on the survival curves for other strains of *B. cereus* (Baril et al., 2011; De Besten et al., 2018; Esteban et al., 2015; Luu-Thi et al., 2014).

In case of *B. subtilis*, *B. licheniformis* and *G. stearothermophilus* shoulders were detected at all temperatures tested. Some authors detected shoulders on the survival curves for these bacterial spore species (Jagannath et al., 2005; Mathys et al., 2007) while others described first order kinetics (Junior and De Massaguer, 2007; Palop et al., 1996; Tola and Ramaswamy, 2014). These discrepancies in the results might have been due to differences in the strains used, in sporulation conditions or the treatment media in which the heat resistance was evaluated. Either way, in this research, shoulders of *B. subtilis* ranged from 0.42 to 1.75 min and D_T values from 0.32 to 1.52 min at temperatures from 100 to 105 °C. These D_T values were lower than those calculated by other authors using a first order kinetics model for different strains of *B. subtilis* (Esteban et al., 2015; Berendsen et al., 2015). For *B. licheniformis*, SI and D_T values ranged from 0.43 to 1.92 and from 0.59 to 2.12 min respectively which were in keeping with those reported by Raso et al. (1995) although other authors reported greater (Palop et al. 1996) values for this species. Finally, out of the five sporulated species under observation, *G. stearothermophilus* showed the highest heat resistance, with SI values of 0.78, 0.95 and 3.22 min and D_T values of 0.48, 0.74 and 2.22 min at 121, 119 and 116 °C respectively. These values were in the range of those reported in the literature for this bacterial spore species, albeit, once again, higher and lower values have also been reported (Esnoz et al., 2006; Mathys et al., 2007; Periago et al., 1998; Rudra et al., 2010). In short, all these results indicated that the behaviour of the selected strains under thermal treatments was normal for their genera.

Shoulders have often been reported on the thermal survival curves for different bacterial spore species (Baril et al., 2011, 2012; Condon-Abanto et al., 2016; Coton et al., 2011) which might be related to spore activation (Sapru et al., 1993), damaged repair mechanisms (Condon et al., 1996; Feeherry et al., 1987) or the presence of agglomerates in the spore suspension (Mathys et al., 2007).

Bacterial spore heat resistance is known to decrease after germination, and enormous effort has focused on studying this step. There is great heterogeneity in the germination rate within a bacterial spore population and, occasionally, a fraction is unable to germinate under lab conditions which are known as superdormant spores. Prior to germination, these superdormant spores must undergo a series of changes called activation, which as yet, is not fully understood (Paidhungat and Setlow, 2002). Shull et al. (1963) postulated that, prior to thermal death, spore activation is needed. In this way, two phenomena might coexist on the survival curves at the beginning of treatment: microbial death and activation, with the latter compensating for the former and thereby producing the shoulders on the survival curves (Condon-Abanto et al., 2016; Iciek et al., 2006). Iciek et al. (2006) suggested that the thermal inactivation kinetics of spores depended on the physiological state of

their cells. When spores are in an activated state, thermal inactivation kinetics would be linear while if super-dormant spores are present, those would produce shoulders.

Other authors (Condon et al., 1996; Feeherry et al., 1987) proposed that the shoulder phenomenon is related to heat injury and damaged repair mechanisms. This observation has been widely described in vegetative cells and bacterial spores where germination must begin before damage occurs (Setlow, 2006). However, bacterial inactivation by heat is not a clear-cut process, as although heat acts when treatment begins, damaging different targets such as DNA, core enzymes and spore membranes (Palop et al., 1998; Setlow, 1995), cells do not die unless they are unable to repair the damage. Therefore, depending on the capacity of the repair mechanisms available, survival curves would have longer or shorter shoulders.

The presence of shoulders has also been related to the presence of aggregates within the bacterial spore suspension (Mathys et al., 2007). Theoretically this is possible because an aggregate will produce a colony which will exist until every last cell dies. In practice, there is a clear relationship of aggregates with the appearance of tails on the survival curves, but their relationship with shoulders is much less. In this respect, for shoulders to appear, all spores must belong to aggregates, which is highly unlikely. If there are individual spores, there should always be a rapid drop in the count initially.

A detailed analysis of the shoulders obtained in our research indicated that for *G. stearothermophilus* superdormant spores were activated since the count when treatment began normally increased slightly but consistently (Fig. 1). For *B. subtilis* and *B. licheniformis*, activation might have occurred, although this was foreseeably related to repair mechanisms since counts never exceeded the preheating count (N0). The absence or short duration of the shoulders in the suspensions of *B. weihenstephanensis* and *B. cereus* indicated that they did not contain superdormant spores and that these strains had little repair capacity in the recovery conditions there were.

3.2. Effect of temperature on heat resistance parameters

As indicated above, the traditional z parameter can be determined on the basis of D_T values obtained from the decimal reduction time curves (DRTC), or from F_T values, from the TDT lines. Since the possible effect of SI on the z values calculated was not known, the z values for the 5 microorganisms was calculated using both approaches. Regarding the TDT lines, 99.99% of bacterial inactivation (TDT-4D), also provided by the GinaFIT tool, was considered as a reference.

Fig. 2 shows the DRTC (solid line) and TDT-4D (dashed line) lines for *B. weihenstephanensis* (A) and *B. cereus* (B), and Fig. 3 for *B. subtilis* (A), *B. licheniformis* (B) and *G. stearothermophilus* (C). The $z D_T/4D_T$ values obtained were 7.9(0.03)/8.5(0.03), 13.4(0.04)/11.5(0.02), 7.4(0.02)/7.5(0.01), 8.1(0.05)/8.1(0.02) and 7.9(0.06)/8.1(0.06) °C (number in brackets represents standard deviation) for *B. weihenstephanensis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* and *G. stearothermophilus* respectively. These values were in accordance with those reported for these and other bacterial species of *Bacillus* (Coton et al., 2011; Raso et al., 1995; Van Asselt and Zwietering, 2006). When both values were compared ($z D_T$ vs. $z 4D_T$) for each bacterial spore species, no significant differences were observed ($p < 0.05$) between the z values calculated using both approaches. The parallelism between DRTC and TDT-4D for *B. weihenstephanensis* and *B. cereus* (Fig. 2) came as no surprise given that their survival curves did not show shoulders (Table 1). However the same parallelism in the other three species (Fig. 3) implies that the SI and D_T parameters are influenced in a similar way by treatment temperature.

Additionally, when the logarithm of SI was plotted versus treatment temperature, a straight line was also obtained. These lines are also included in Fig. 3 (dotted lines). From the inverse of the slope of these lines, the z - SI values (i.e. the rise in temperature required to reduce the SI parameter 10-fold) of 8.2(0.08), 6.8(0.23) and 7.9(0.09) °C (number in

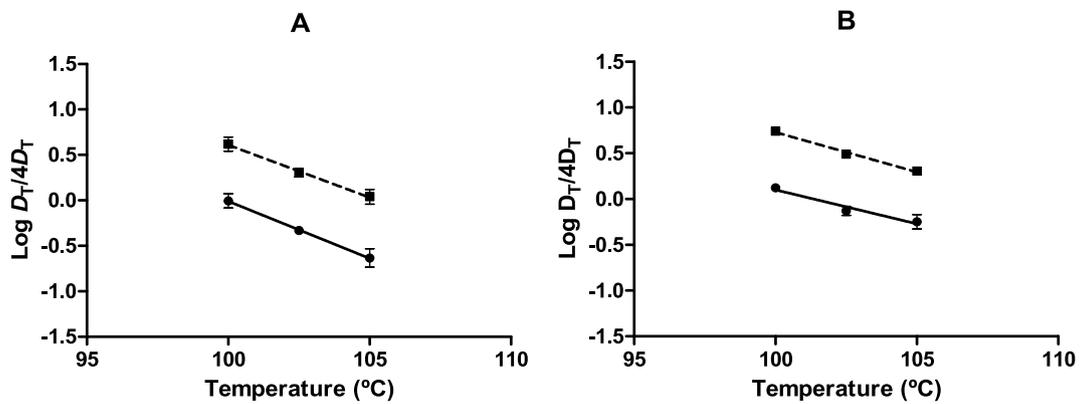


Fig. 2. DRT curves (block lines) and TDT-4D curves (dashed lines) calculated for *B. weihenstephanensis* (A) and *B. cereus* (B) in a pH 7 McIlvaine citrate phosphate buffer. (*D* and 4*D* values were calculated in minutes).

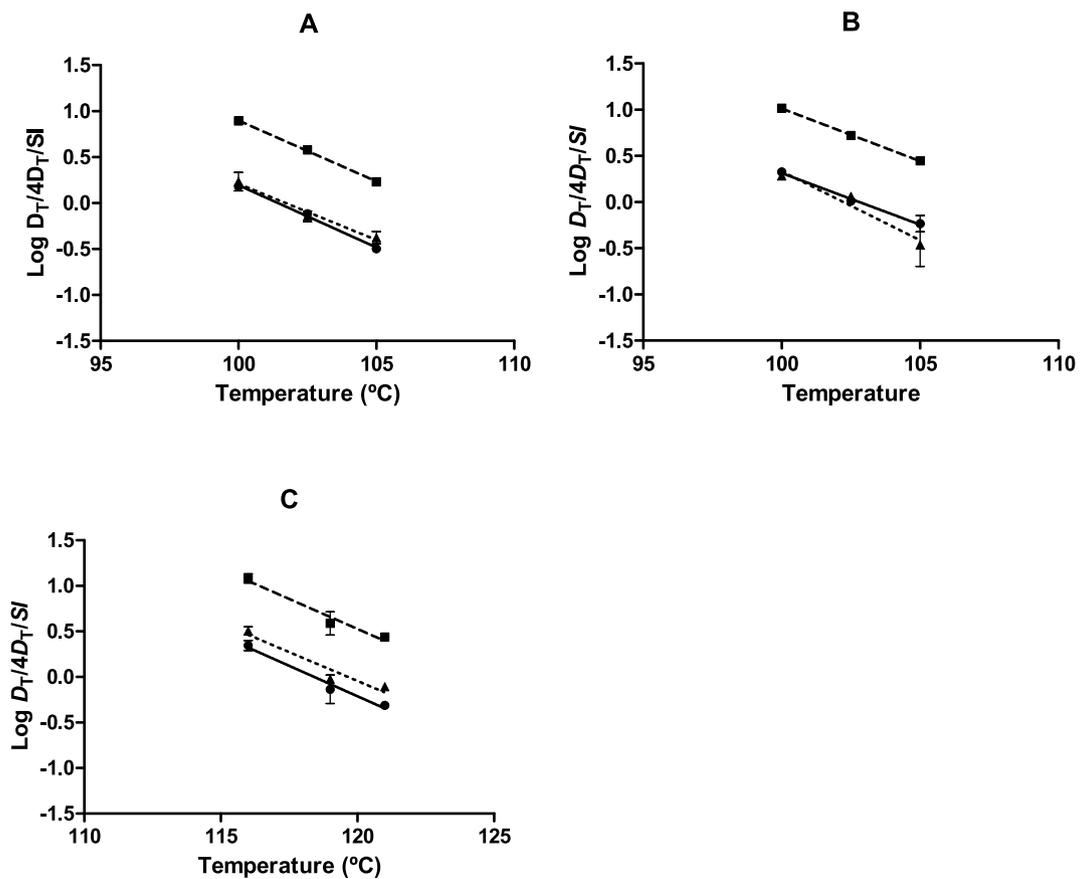


Fig. 3. DRT curves (block lines), TDT-4D curves (dashed lines) and z-SI curves (dotted lines) calculated for *B. subtilis* (A), *B. licheniformis* (B) and *G. stearthermophilus* (C) in a pH 7 McIlvaine citrate phosphate buffer.

Table 2

Parameter *SI/D* calculated from the thermal resistance parameters obtained for the five sporulated species in pH 7 McIlvaine citrate phosphate buffer at different temperatures.

T	<i>B. weihenstephanensis</i>		<i>B. cereus</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>B. licheniformis</i>		<i>G. stearthermophilus</i>	
	<i>SI/D</i>	<i>SD</i>	<i>SI/D</i>	<i>SD</i>	<i>SI/D</i>	<i>SD</i>	<i>SI/D</i>	<i>SD</i>	<i>SI/D</i>	<i>SD</i>
100	0.20	0.01	0.14	0.09	1.16	0.26	0.91	0.02	-	-
102.5	0.32	0.08	0.17	0.17	0.94	0.11	1.12	0.10	-	-
105	0.73	0.29	0	0.16	1.33	0.21	0.81	0.47	-	-
116	-	-	-	-	-	-	-	-	1.45	0.14
119	-	-	-	-	-	-	-	-	1.30	0.13
121	-	-	-	-	-	-	-	-	1.60	0.02

T, treatment temperature (°C); *SD*, standard deviation calculated from at least three replicates.

brackets represent the standard deviation) were calculated for *B. subtilis*, *B. licheniformis* and *G. stearothermophilus* respectively. When these values were compared with traditional ones for $z D_T$ and $z 4D_T$, no significant differences ($p < 0.05$) were observed for any of the species under observation, hence, endorsing our hypothesis.

3.3. Reparametrization of the traditional thermobacteriology equation

As the thermal dependence of the SI and D_T values was the same, a new parameter (A) representing the relationship between them was proposed. Table 2 shows the SI/D values and its standard deviation for each bacterial spore species under study at all temperatures tested. A statistical analysis revealed no significant differences ($p < 0.05$) among the values calculated at different temperatures for each particular sporulated species. Therefore, it could be concluded that this relationship is constant, regardless of treatment temperature and also that it is characteristic of each microorganism, at least among the bacterial spore species under study. This parameter could be used for directly comparing bacterial species with different resistances to heat. Fig. 4 shows the SI/D parameter, calculated with all the values obtained at different temperatures. As seen in the figure, *B. cereus* and *B. weihenstephanensis* showed SI/D values not significantly different from zero (<0.5) and no significant differences were observed between these two microorganisms. However, *B. subtilis* and *B. licheniformis* showed shoulders whose lengths were approximately equivalent to the D_T value (SI/D parameters of 1.1 and 0.94 respectively) while *G. stearothermophilus* had a SI/D value equal to 1.4 which meant that this bacterial spore had a shoulder length 1.4-fold higher than the D_T value at any treatment temperature. As a consequence, if the traditional thermobacteriology equation (Eq. (2)) is used to calculate the sterilization time for these microorganisms, an approximate value would be obtained for *B. cereus* and *B. weihenstephanensis*, but for the other three bacterial spores, the equation would underestimate treatment time which would mean a 10-fold or higher increase in the survival risk in relation to that estimated and the greater the SI/D value is, the greater the miscalculation will be.

Since the A parameter ($= SI/D$) was characteristic and constant it could be calculated from a single thermal inactivation curve for the target microorganism and enabled the shoulder length to be estimated at every treatment temperature. Introducing the new parameter A into the

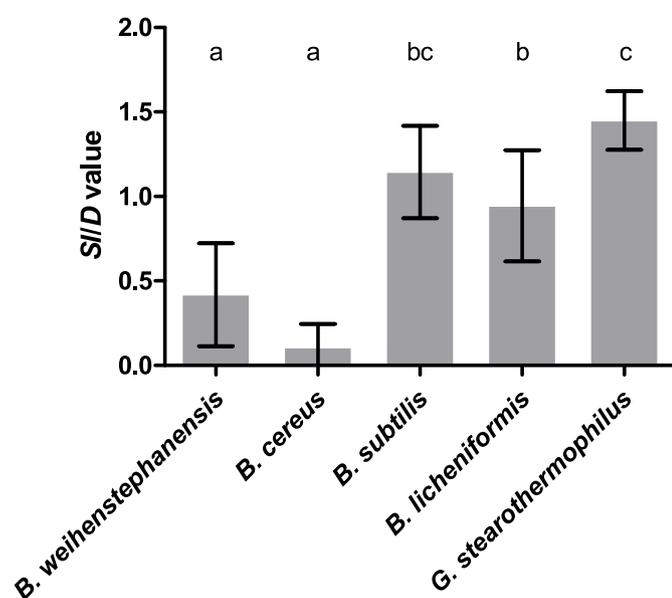


Fig. 4. Magnitude of the parameter SI/D calculated for the five bacterial spores under observation based on their thermal resistance parameters in a pH 7 McIlvaine citrate phosphate buffer.

traditional thermobacteriology equation, this would be reparametrized as equation (7).

$$F_T^z = D_T \times \left(\text{Log} \left(\frac{N_0}{N_t} \right) + A \right) \quad (\text{Eq. 7})$$

Fig. 5 enables the magnitude of the divergences to be quantified by comparing the calculated treatments with the traditional and proposed equation. Fig. 5 includes the theoretical curves calculated with the traditional equation (black line) considering $D_{116} = 2.94$ and the proposed equation (grey line) considering $A = 1.4$ and $D_{116} = 2.2$. These values were those calculated from the experiment obtained for *G. stearothermophilus* at 116 °C assuming first order kinetics (traditional

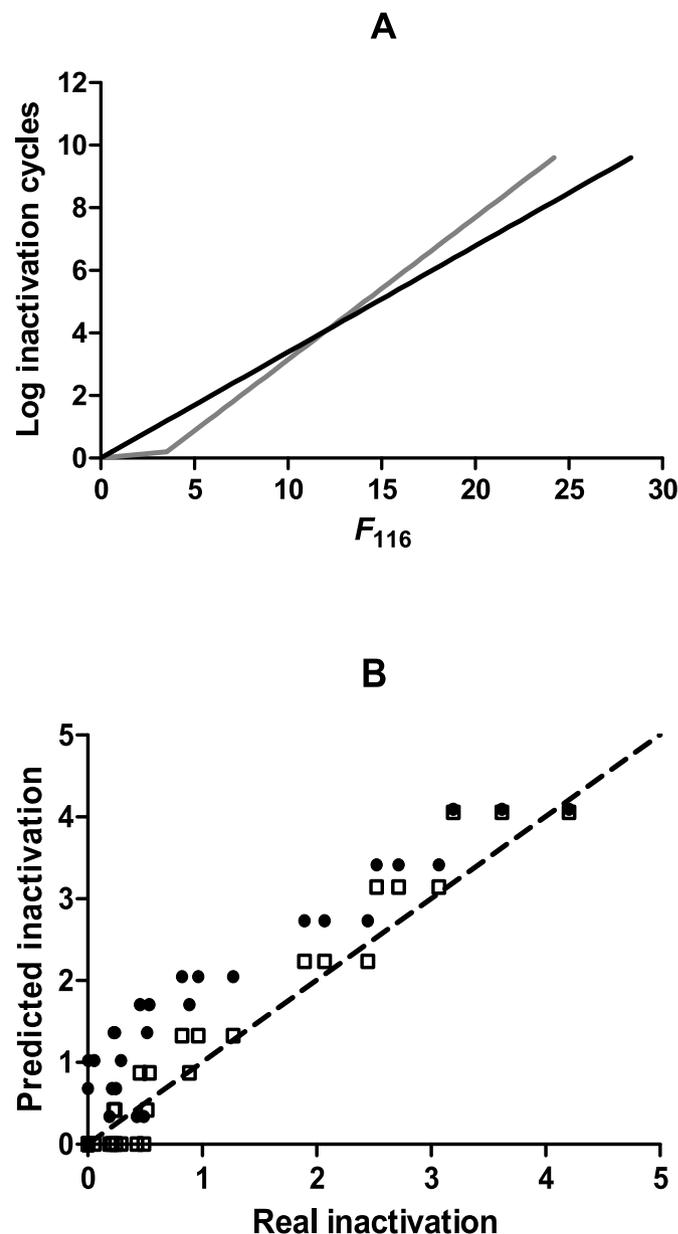


Fig. 5. Theoretical log inactivation cycles calculated using traditional (black line) and reparametrized (grey line) equation using heat resistance parameters for *G. stearothermophilus* obtained at 116 °C in this research (A). And real vs. predicted F values for achieving different inactivation levels (from 0.1 to 5 log cycles) calculated using the traditional (block symbols) and re-parametrized (open symbols) thermo-bacteriology equation for *B. subtilis*, *B. licheniformis* and *G. stearothermophilus* at different treatment temperatures in a pH 7 McIlvaine citrate phosphate buffer.

equation) and using the Geeraerd' equation (proposed equation). The figure represents the required F_{116} values, calculated using both approaches, in order to achieve different inactivation levels. Also Fig. 5B shows the real inactivation achieved versus the predicted inactivation, calculated using the traditional equation (black symbols) and the proposed equation (grey symbols).

As observed in Fig. 5B, the predictions yielded by the re-parametrized equation were better than those obtained with the traditional one and these differences in predictions were more pronounced for low cycles of inactivation in the range shown. Moreover, as observed on the theoretical curves (Fig. 5A) at low log cycles of inactivation (up to 4), the predicted inactivation obtained using the traditional equation was higher than that resulting from the re-parametrized equation (i.e. in this inactivation range, the use of the traditional equation for the calculus of sterilization times would increase spoilage risks by over 10-fold). Conversely, over 4 log cycles of inactivation, the heat resistance of the bacterial spore (here *G. stearothermophilus*) was overestimated which meant that calculations with the traditional equation would mean overestimating the required treatment time (i.e. product overheating).

Van Asselt and Zwietering (2006) proposed that for an initial approach in the calculus of heat treatment, SI might not need to be considered; although the same authors also indicated that for specific treatment conditions, this parameter should be taken into account. Either way, clearly, the SI parameter must be taken into account in the calculus of heat treatment in order to avoid errors. Furthermore, in this research, it has been demonstrated that the parameter SI/D is characteristic for each bacterial spore and independent of treatment temperature. However, it is common knowledge that many factors such as, pH, aw, sporulation conditions and strain variability affect the thermal resistance of bacterial spore species (den Besten et al., 2018; Gaillard et al., 1998; Palop et al., 1996; 1999; Tola and Ramaswamy, 2014); so a more in-depth study in which the impact of these variables on this new parameter will be evaluated would be of interest.

4. Conclusions

From the results obtained in this research it can be concluded that the presence of shoulders on the thermal inactivation curves among the aerobic bacterial spore species studied is characteristic of each microorganism. From the bacterial spores considered in this research *B. weihenstephanensis* (n° 108) and *B. cereus* (STCC 148) did not show significant shoulders while *B. subtilis* (STCC 4522), *B. licheniformis* (STCC 4523) and *G. stearothermophilus* (STCC4517) did. Bacterial spores with higher heat resistance also showed greater SI values.

The z values obtained from the DRTC lines and TDT lines for $4D$ were not significantly different. Shoulder length proved to be an exponential function of treatment temperature. The z - SI values did not differ significantly from the z D_T and z $4D_T$ values and these findings would explain why the SI/D parameter was characteristic of each bacterial spore species tested and independent of treatment temperature.

The new parameter considered in equation (7) would enable total treatment time to be recalculated in order to achieve a desired inactivation level, considering the shoulder length of the target microorganism, regardless of the desired treatment temperature.

Declaration of competing interest

There are no known conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the support of the European Regional Development Fund, MINECO-CICYT (AGL2015-69565-P, PGC2018-093789-B-100) and the Department of Innovation Research and University of the Aragon Government and European Social Fund (ESF). V. Ruiz gratefully acknowledge the financial support for their

doctoral studies from the Ministerio de Educación y Ciencia de España.

References

- Baril, E., Coroller, L., Postollec, F., Leguerinel, I., Boulais, C., Carlin, F., Mafart, P., 2011. The wet-heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores produced in a two-step sporulation process depends on sporulation temperature but not on previous cell history. *Int. J. Food Microbiol.* 146, 57–62.
- Baril, E., Coroller, L., Couvert, O., Leguerinel, I., Postollec, F., Boulais, C., Carlin, F., Mafart, P., 2012. Modeling heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus licheniformis* spores as function of sporulation temperature and pH. *Food Microbiol.* 30, 29–36.
- Berendsen, E.M., Zwietering, M.H., Kuipers, O.P., Wells-Bennik, M.H.J., 2015. Two distinct groups within the *Bacillus subtilis* group display significantly different spore heat resistance properties. *Food Microbiol.* 45, 18–25.
- Bigelow, W., 1921. The logarithmic nature of thermal death time curves. *J. Infect. Dis.* 528–536.
- Cebrián, G., Condón, S., Manas, P., 2017. Physiology of the inactivation of vegetative bacteria by thermal treatments: mode of action. influence of environmental factors and inactivation kinetics. *Foods* 12 (6), 107.
- Condon-Abanto, S., Arroyo, C., Alvarez, I., Condon, S., Lyng, J.G., 2016. Application of ultrasound in combination with heat and pressure for the inactivation of spore forming bacteria isolated from edible crab (*Cancer pagurus*). *Int. J. Food Microbiol.* 223, 9–16.
- Condon, S., Oria, R., Sala, F.J., 1987. Heat resistance of microorganisms: an improved method for survival counting. *J. Microbiol. Methods* 7, 37–44.
- Condón, S., Palop, A., Raso, J., Sala, F.J., 1996. Influence of the incubation temperature after heat treatment upon the estimated heat resistance values of spores of *Bacillus subtilis*. *Let. Appl. Microbiol.* 22, 149–152.
- Coton, M., Denis, C., Cadot, P., Coton, E., 2011. Biodiversity and characterization of aerobic spore-forming bacteria in surimi seafood products. *Food Microbiol.* 28, 252–260.
- Davies, F.L., 1975. Heat resistance of *Bacillus* species. *J. Soc. Dairy Technol.* 28 (2), 69.
- Dawson, R.M.C., Elliot, D.C., Elliot, W.H., Jones, K.M., 1974. pH, buffers and physiological media. In: Dawson, R.M.C., Elliot, D.C., Elliot, W.H., Jones, K.M. (Eds.), *Data for Biochemical Research*, second ed. Clarendon press, Oxford, UK, pp. 484–485.
- De Besten, H.M.W., Wells-Bennik, M.H.J., Zwietering, M.H., 2018. Natural diversity in heat resistance of bacteria and bacterial spores: impact on food safety and quality. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 9 (1), 383–410.
- Esnoz, A., Periago, P.M., Conesa, R., Palop, A., 2006. Application of artificial neural networks to describe the combined effect of pH and NaCl on the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus*. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 153–158.
- Esteban, M.D., Conesa, R., Huertas, J.P., Palop, A., 2015. Effect of thymol in heating and recovery media on the isothermal and non-isothermal heat resistance of *Bacillus* spores. *Food Microbiol.* 48, 35–40.
- Esty, J., Meyer, K., 1922. The heat resistance of the spores of *B. botulinum* and allied anaerobes. *XI. J. Infect. Dis.* 650–664.
- Fda, 2001. Hazard analysis and critical control point (HACCP): procedures for the safe and sanitary processing and importing of juices: final rule. *Fed. Regist.* 66.
- Feeherry, F.E., Munsey, D.T., Rowley, D.B., 1987. Thermal inactivation and injury of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 365–370.
- Gaillard, S., Leguerinel, I., Mafart, P., 1998. Model for combined effects of temperature, pH and water activity on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. *J. Food Sci.* 63, 887–889.
- Geeraerd, A.H., Herremans, C.H., Van Impe, J.F., 2000. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *Int. J. Food Microbiol.* 59, 185–209.
- Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P., Van Impe, J.F., 2005. GlnaFit: a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *Int. J. Food Microbiol.* 102, 95–105.
- Iciek, J., Papiewska, A., Molska, M., 2006. Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores during thermal processing. *J. Food Eng.* 77, 406–410.
- Jagannath, A., Tsuchido, T., Membre, J.M., 2005. Comparison of the thermal inactivation of *Bacillus subtilis* spores in foods using the modified Weibull and Bigelow equations. *Food Microbiol.* 22 (2–3), 233–239.
- Junior, J.N., De Massaguer, P.R., 2007. Thermal death kinetics of *B. stearothermophilus* spores in sugarcane must. *J. Food Process. Eng.* 30, 625–639.
- Katzin, L.I., Sandholzer, L.A., Strong, M.E., 1943. Application of the decimal reduction time principle to a study of the resistance of coliform bacteria to pasteurization. *J. Bacteriol.* 45 (3), 265.
- Luu-Thi, H., Khadka, D.B., Michiels, C.W., 2014. Thermal inactivation parameters of spores from different phylogenetic groups of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* 189, 183–188.
- Mathys, A., Heinz, V., Schwartz, F.H., Knorr, D., 2007. Impact of agglomeration on the quantitative assessment of *Bacillus stearothermophilus* heat inactivation. *J. Food Eng.* 81, 380–387.
- Membre, J.M., Amézquita, A., Basset, J., Giavedoni, P., Blackburn, C. de W., Gorris, L.G. M., 2006. A probabilistic modelling approach in thermal inactivation: estimation of postprocess *Bacillus cereus* spore prevalence and concentration. *J. Food Prot.* 69 (1), 118–129.
- Paidhungat, M., Setlow, P., 2002. Germination and Outgrowth. *Bacillus Subtilis* and its Closest Relatives. *American Society of Microbiology*, pp. 537–548.
- Palop, A., Raso, J., Pagan, R., Condon, S., Sala, F.J., 1996. Influence of pH on heat resistance of *Bacillus licheniformis* in buffer and homogenised foods. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 1–10.

- Palop, A., Mañas, P., Condón, S., 1999. Sporulation temperature and heat resistance of *Bacillus* spores: a review. *J. Food Saf.* 19, 57–72.
- Palop, A., Rutherford, G.C., Marquis, R.E., 1998. Inactivation of enzymes within spores of *Bacillus megaterium* ATCC 19213 by hydroperoxides. *Can. J. Microbiol.* 44, 465–470.
- Periago, P.M., Fernandez, P.S., Salmeron, M.C., Martinez, A., 1998. Predictive model to describe the combined effect of pH and NaCl on apparent heat resistance of *Bacillus stearothermophilus*. *Int. J. Food Microbiol.* 44, 21–30.
- Ramirez-Peralta, A., Zhang, P., Li, Y.Q., Setlow, P., 2012. Effects of sporulation conditions on the germination and germination protein levels of *Bacillus subtilis* spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2689–2697.
- Raso, J., Palop, A., Bayarte, M., Condon, S., Sala, F.J., 1995. Influence of sporulation temperature on the heat-resistance of a strain of *Bacillus licheniformis* (Spanish type culture collection-4523). *Food Microbiol.* 12, 357–361.
- Rudra, S.G., Chhibber, S., Shivhare, U.S., 2010. Thermal death kinetics of *B. stearothermophilus* in coriander leaf puree. *Biosyst. Eng.* 106, 544–550.
- Sapru, V., Smerage, G.H., Teixeira, A.A., Lindsay, J.A., 1993. Comparison of predictive models for bacterial spore population resources to sterilization temperatures. *J. Food Sci.* 58, 223–228.
- Sarrias, J., Valero, M., Salmerón, M., 2002. Enumeration, isolation and characterization of *Bacillus cereus* strains from Spanish raw rice. *Food Microbiol.* 19, 589–595.
- Setlow, P., 1995. Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spores of *Bacillus* species. *Ann. Rev. Microbiol.* 49, 29–54.
- Setlow, P., 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J. Appl. Microbiol.* 101, 514–525.
- Shull, J.J., Cargo, G.T., Ernst, R.R., 1963. Kinetics of heat activation and of thermal death of bacterial spores. *Appl. Microbiol.* 11, 485–487.
- Tatsinkou Fossi, B., Tatah Kihla Akoachere, J.F., Nchanji, G.T., Wanji, S., 2017. Occurrence, heat and antibiotic resistance profile of *Bacillus cereus* isolated from raw cow and processed milk in Mezam Division, Cameroon. *Int. J. Dairy Technol.* 70, 43–51.
- Tola, Y.B., Ramaswamy, H.S., 2014. Thermal destruction kinetics of *Bacillus licheniformis* spores in carrot juice extract as influenced by pH, type of acidifying agent and heating method. *LWT - Food Sci. Technol. (Lebensmittel-Wissenschaft -Technol.)* 56 (1), 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.013>.
- Van Asselt, E.D., Zwietering, M.H., 2006. A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 107, 73–82.

Thermal inactivation kinetics of *Geobacillus stearothermophilus* spores obtained at different sporulation temperatures heated at different pH.

ABSTRACT

Deviations in linearity in survival curves are common in inactivation kinetics during heat treatment. These might lead one to underestimate how effective thermal treatment is. In previous research we reported a relationship between decimal reduction time values (D_T) and shoulder lengths (S) of survival curves which was characteristic of each microorganism. However, the impact of other factors such as sporulation temperature and pH of the treatment media is still not known. The objective of this research was to evaluate the effect of sporulation temperature (45, 55 and 65 °C) and pH (4.0, 5.0, 6.0 and 7.0) treatment has on the profile of survival curves and on the relationship between S/D_T of *G. stearothermophilus* STCC 4517. The results obtained demonstrated that all the spore suspensions, independently of sporulation temperature and pH, showed survival curves with shoulder phenomena, whose duration was an exponential function of treatment temperature. Although both parameters had a significant effect on heat resistance, the relationship between the shoulder length and D_T values was constant at all pHs for spores produced at the optimum sporulation temperature.

INTRODUCTION

To date, bacterial spores are still considered to be the greatest threat in heat-treated food plants due to their extreme resistance to physical and chemical treatments (Andre *et al.*, 2017). Though different research has been carried out to optimize non-thermal treatments, in order to reduce spore populations, these technologies are unsuitable for being the sterilisation method for preserving food. This is because bacterial spores are highly resistant to these techniques (Manas *et al.*, 2005). This makes heat the most effective technology for food sterilization (Iciek *et al.*, 2006).

Inactivation kinetics for bacterial spores produced by heat treatment was first described in 1922 by Esty and Meyer (Esty *et al.*, 1922). Over the next century huge efforts were made in order to deep inside the mechanisms behind this inactivation phenomena.

However, as yet the mechanisms for this remain unknown and the death of bacterial spores from heat treatment, is considered exponential in the calculus of industrial processes; where traditional D_T , z , F_T^z values and thermal death time (TDT) curves are used. However, this principle is often not fulfilled due to deviations from linearity in bacterial spore survival curves. These deviations are known as shoulders or tails and are the greatest shortcoming weakness for the precision of the heat treatments design using the traditional method (i.e. using survival curves).

Moreover, such deviations might indicate that bacterial spores are less affected by heat at certain stages of heat treatment, since they may appear at the beginning of treatment (shoulder) or at the end (tails). The possible causes of these deviations have been widely discussed for some years and have been classified as mechanistic and vitalistic theories (Cerf, 1977). Due to

the importance of these deviations on calculating heat treatments, many authors have developed different mathematical models to describe them in the survival curves (Cebrián *et al.*, 2017).

Ruiz *et al.* (2021) considered these models to be descriptive but not predictive due to the lack of data provided on the kinetics of shoulders due to the empirical limitations of the methods used. Authors solved both problems using a mixing method for determining survival curves (Raso *et al.*, 1998) and a simple mathematical method for determining shoulder length (Geeraerd *et al.* (2000). Authors found that shoulder length was an exponential function of treatment temperature and the relation shoulder length divided by decimal reduction time (Sl/D_T) is constant at all treatment temperatures and characteristic of each microorganism. With this data one may calculate the time needed to inactivate bacterial spores, taking into account shoulder length, at any temperature, with a single survival curve using equation 1:

$$F_T^z = D_T \times \left(\log \left(\frac{N_0}{N_t} \right) + A \right) \quad (\text{Eq. 1})$$

Where F_T^z is sterilization time, D_T is decimal reduction time, N_0 initial concentration of the target microorganism, N_t microbial survival probability and A represents the relationship between shoulder length and the decimal reduction time value.

The results reported by the authors (Ruiz *et al.*, 2021) were observed using bacterial spore suspensions produced at optimum sporulation temperatures and then treated in a citrate-phosphate buffer with a pH of 7.0. However, it is well known that microbial thermal resistance is determined by a genetic component and various external factors. These could be classified

according to the moment when heat treatment was applied, when they act as: previous, simultaneous or posterior. Within the “previous” category media composition and sporulation temperature are included, both of which might interact and produce different effects with heat resistance (Palop *et al.*, 1999). In respect to media composition general conclusions cannot be drawn as it varies too much. However, in terms of sporulation temperature, it has been reported that the higher the sporulation temperature, the higher the thermal resistance for the spores produced (García *et al.*, 2010; Palop *et al.*, 1999; Planchon *et al.*, 2011), until a certain level where a plateau is reached or the resistance began to decrease (González *et al.*, 1999; Lindsay *et al.*, 1990). However, the degree to which heat resistance increases depends on the bacteria species (Palop *et al.*, 1999).

Simultaneous factors mainly include the physico-chemical characteristics of the treatment media. At a glance from the literature it may be deduced that the key factors are water activity and pH (Palop *et al.*, 1999; Samapundo *et al.*, 2011); with pH being the most relevant for canneries. This is why it is one of the most studied factors in thermal resistance studies in the food industry. It is generally accepted that heat resistance is maximal at neutral pHs and decreases with acidification (Esteban *et al.*, 2013; Leguerinel *et al.*, 2001; Lopez *et al.*, 1996; Mallidis *et al.*, 1990; Palop *et al.*, 1999; Pontius *et al.*, 1998).

Although, it is well known that the sporulation temperature and pH of the treatment medium modify the D_T values of bacterial spores, little is known about how they affect the shoulder length of survival curves. This gap in knowledge could cause

mistakes in calculating the heat treatment parameters in food processing when the traditional model is employed (Ruiz *et al.*, 2021). From the results obtained in our last article (Ruiz *et al.*, 2021) it may be deduced that from the species under study the bigger magnitude of the relation Sl/D_T was observed for *G. stearothermophilus* STCC 4517, which is one of the three bacteria most frequently associated with canned food spoilage (Andre *et al.*, 2017).

The present research was designed to solve the following questions: do the environmental factors that affect D_T values also influence shoulder length? Do shoulders still change exponentially with treatment temperature in different treatment media conditions? Does the Sl/D_T relationship remain constant under different treatment conditions?

Thus, in order to answer these questions, the main objectives of this research were twofold. Firstly, to determine the effect pH of the treatment medium had on the survival curves of *G. stearothermophilus* STCC 4517 and secondly, to observe how sporulation temperature influenced the length of shoulders on the inactivation curves for *G. stearothermophilus* STCC 4517.

MATERIAL AND METHODS

Spore suspension preparation. The strain of *G. stearothermophilus* (STCC 4517) employed in this research was obtained from the Spanish Type Culture Collection (STCC) and was stored at -80 °C. To prepare the spore suspension, one single colony from a nutrient agar plate (Oxoid, Basingstoke, UK) was transferred to a pre-culture of nutrient broth (Oxoid) with 0.6 % yeast extract (Oxoid) (NBYE) which was incubated at 55 °C for 24 hours. From the pre-culture, plates of nutrient agar (Oxoid) with yeast extract (0.6%) (Oxoid) (NAYE) and 3 ppm (w/v) of manganese

sulphate (Carlo Erba, Milan, Italy) added were inoculated and incubated at 45, 55 or 65 °C for 72 hours. In order to let the spores recover, a pH 7 McIlvaine citrate phosphate buffer was employed. In order to remove vegetative cells and debris, the suspension was centrifuged at 4000 rpm (Jouan centrifuge, CR 4.11, Saint-Herblain, France) for 20 min and re-suspended in a new buffer four times and finally pasteurised at 80 °C for 5 min in order to inactivate the remaining vegetative cells. The spore suspension was stored at 4 °C up to a maximum of 4 months.

Heat treatments, recovery and counting survivors for treated spores.

Heat treatments were carried out in a MTS resistometer described by Raso *et al.* (1998) that consisted in a treatment chamber of 23 ml which was inside a main 700ml vessel where the heating medium was. In the main chamber there was an electric heater and a refrigeration coil to ensure that the treatment temperature remained constant during treatment and an agitation device to keep the temperature evenly distributed. The MTS resistometer also had valves for pressurisation, insertion of a thermocouple and inoculation and extraction of the samples. This device is especially useful for studying the initial moments of treatment because it worked without a “lag” in the heating steps.

Heat treatments were carried out using McIlvaine citrate-phosphate buffers of pH 7.0, 6.0, 5.0 and 4.0 (Dawson *et al.*, 1974) as the treatment medium. For the experiments, the device was filled with the treatment medium and when the temperature reached the desired value (± 0.1 °C), 0.2 ml of the spore suspension was injected into the treatment chamber. For sampling, 0.1 ml was collected at the desired times, diluted and pour-plated in NAYE. All experiments were carried out at least in triplicate.

The plates were incubated at 55 °C for 48 hours in aerobic conditions and counted with an automatic colony counting image analyser (Protos, Synoptics, Cambridge, UK) as described previously (Condón *et al.*, 1987).

Data analysis. The data obtained in this research were fitted using equation 2 (Geeraerd *et al.*, 2000) using the Excel tool developed by Geeraerd *et al.* (2005) called GInaFIT.

$$N_t = N_0 \times e^{-k_{max} \times t} \left(\frac{e^{-k_{max} \times Sl}}{1 + (e^{k_{max} \times Sl} - 1)e^{-k_{max} \times t}} \right) \quad (\text{Eq. 2})$$

Where Sl represented the shoulder length, defined as the time required to reach the exponential inactivation rate; K_{max} corresponded to the inactivation rate, i.e. the slope of the exponential part of the survival curve; N_0 the microbial count at the onset of treatment and N_t the microbial count at time t . From equation 2, the decimal reduction time (D_T) can be calculated with equation 3.

$$D_T = \frac{2.303}{K_{max}} \quad (\text{Eq. 3})$$

For quantification purposes, the z and $z-Sl$ value, previously described by Condon-Abanto *et al.* (2016), was also calculated. The z and $z-Sl$ values are defined by the increase in temperature needed to reduce the D_T and Sl values respectively by 10-fold.

An essential regression Excel tool included in Microsoft Office Excel software (Microsoft; Washington; USA) was also employed to study the interactions between the sporulation temperature and pH with Sl/D_T value.

For the statistical analysis, the student's t -test and a one-way ANOVA were performed using the GraphPad PRISM 5 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA), and differences were considered significant for $p < 0.05$. To evaluate the goodness of fits R^2 , $RMSE$, Bias factor (Bf) and Accuracy factors (Af) were also calculated.

RESULTS AND DISCUSSION

In this research heat resistance and profiles of the survival curves of *G. stearothermophilus* STCC 4517 sporulated at different temperatures (45, 55 and 65 °C) were evaluated in medias of different pHs (4.0, 5.0, 6.0 and 7.0) in order to elucidate the effect of these two parameters on the Sl/D_T ratio.

Effect of pH on thermal resistance parameters of *G. stearothermophilus* STCC 4517

In this part of the study the heat resistance of *G. stearothermophilus* sporulated at 55 °C was evaluated at 4 different treatment temperatures and at a pH of 4.0, 5.0, 6.0

and 7.0. In order to obtain the thermal resistance parameters, experimental values were fitted using Geeraerd's equation. Table 1 shows the heat resistance parameters calculated (Sl and D_T) using this equation. The table also include the coefficient of determination (R^2) and the Sl/D_T ratio previously described in Ruiz *et al.* (2021). As observed in the table a good fit was obtained ($R^2 > 0.956$) for all tested conditions.

The results obtained (Table 1) showed that both D_T and Sl values decreased as the treatment temperature raised and also when the pH of the treatment medium decreased. The treatment pH is of great significance in terms of how resistant bacterial spores are to heat. As a result, there is plenty of research on the effect on thermal resistance. In this work, acidification of the treatment medium reduced heat resistance of *G. stearothermophilus* spores; this sensitising effect has been widely reported (Baril *et al.*, 2012; Cameron *et al.*, 1980; Palop *et al.*, 1996; Palop *et al.*, 1999; Pontius *et al.*, 1998; Rigaux *et al.*, 2013). As observed in Table 1, the D_{113} value of *G. stearothermophilus* STCC 4517 was reduced 24-fold when the pH of the treatment medium fell from 7.0 to 4.0. This variation on the thermal resistance shown by the *G. stearothermophilus* strain under study was higher than those reported for other ones. Lopez *et al.* (1996) observed a 10-fold reduction on the D_{115} of other strains of *G. stearothermophilus* with similar reductions in pH; and Periago *et al.* (1998) observed a more than 6-fold increase in D_{120} when pH increased from 5.75 to 6.5.

In order to study the effect of treatment temperature on the sensitizing effect of pH, z values were calculated from decimal

reduction time lines (DRTC) (Figure 1A). No statistical significant differences ($p < 0.05$) were observed among these values at pH 4.0 (10.9 °C) and pH 5.0 (12.5 °C) but significant reductions were observed at pH 6.0 (9.4 °C) and pH 7.0 (7.8 °C). These results indicated that the effect of acidification was greater at lower treatment temperatures. Other authors have also reported that at lower temperatures, the reduction in D_T values is higher than those observed at higher treatment temperatures (Condón *et al.*, 1992; Gaillard *et al.*, 1998; Lopez *et al.*, 1996; Palop *et al.*, 1999). Moreover, Sala *et al.* (1995) reported that the effect of pH on z values depended on sporulation temperature, with the sensitization effect of pH being less pronounced at high temperatures when the sporulation temperature is higher. This might explain the behaviour observed of the thermophilic bacterial spore used in this research.

As mentioned, the pH of the treatment medium has been widely studied for this bacterial species. However, there is no data about its effect on the shoulder lengths of its survival curves. Figure 1B shows the relationship between shoulder length and treatment temperature at the different pHs tested. As observed in the figure, there was an exponential relationship between shoulder length and treatment temperature at all the different pHs. Moreover, the figure also shows that, as with D_T values, shoulder length values were lower when the pH of the treatment medium was also lower. Although shoulder length kinetics have not been studied in depth, Esteban *et al.* (2013) also reported that shoulder lengths for the inactivation curves of *B. sporothermodurans* were shorter when the treatment medium was acidified. From

figures (1A and 1B) it can be also observed the similar behaviour displayed in correlation of D_T and Sl values with the treatment temperature, i.e. a bigger sensitizing effect of pH at lower treatment temperatures.

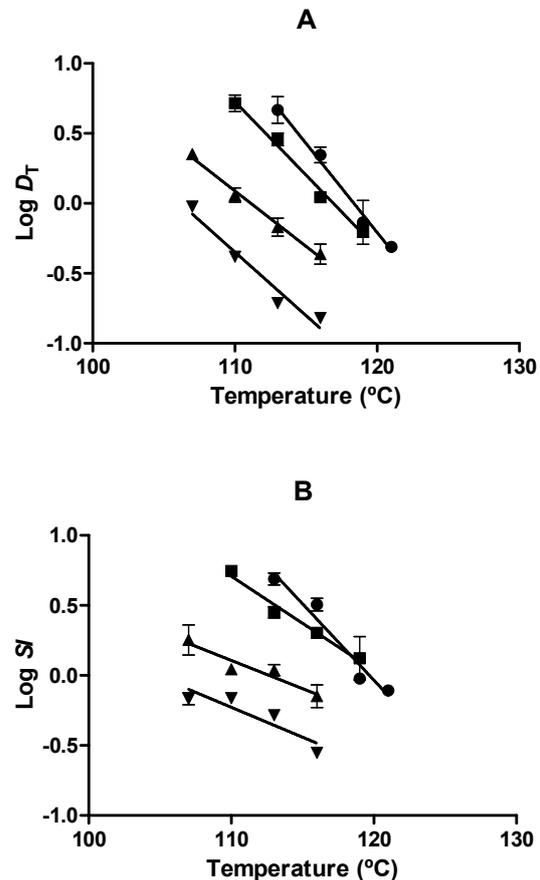


Figure 1. DRTC lines (A) and z - Sl lines (B) for *G. stearothermophilus* sporulated at 55 °C, at pH 7.0 (●), pH 6.0 (■), 5.0 (▲) and 4.0 (▼).

The mechanisms by which acidification modifies spore heat resistance is not fully known, albeit some hypothesis have been set out. Gould *et al.* (1975) proposed that a spore suspension with an acid pH could produce cortex carboxyl groups protonation. This would cause this structure to collapse as well as protoplast rehydration and loss of heat resistance, in turn. This hypothesis is supported as the bacterial spore' cortex becomes thinner after heat treatment. This impact is greater

in the treatment media with acid pHs (Okereke *et al.*, 1990). Other authors (Bender *et al.*, 1985) have suggested that protons of acid media could interact with spore salts thereby causing some divalent cations to be released. This has been related to heat resistance (Palop *et al.*, 1999) causing protein structure destabilisation and thermal denaturation.

The relationship between Sl and D_T values can be better appreciated in figure 2, where $\text{Log } Sl$ values are represented versus $\text{Log } D_T$ values at all pHs and temperatures tested. As observed in the figure a linear correlation, independent of the pH exists. As also observed in the figure the regression line of the points does not pass through the frame origin which indicates that Sl values are higher than D_T values at all pHs tested for the bacterial spore under study. On the other side, the slope of the line was lower than 1. Since the shoulders observed in the inactivation curves of the spore species under study are probably related with the activation phenomenon (Ruiz *et al.*, 2021) this behaviour might be related with a different thermal-dependence of activation and death phenomena produced by heat. This point would need a deeper study to clarify this hypothesis.

Figure 3 shows the average Sl/D_T values calculated for each treatment pH considering those independent of the treatment temperature.

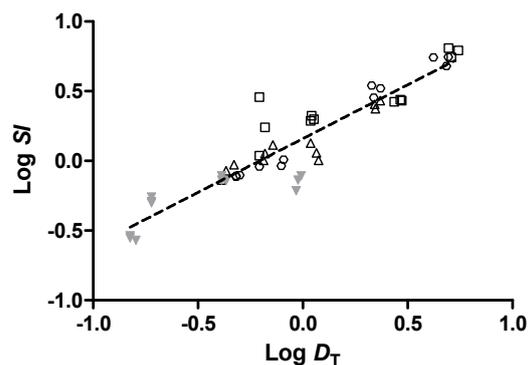


Figure 2. Correlation between $\text{Log } D_T$ and $\text{Log } Sl$ values calculated for *G. stearothermophilus* STCC 4517 sporulated at 55 °C and heated in Mcllvaine citrate phosphate buffer of pH 7.0 (○), 6.0 (□), 5.0 (△) and 4.0 (▼).

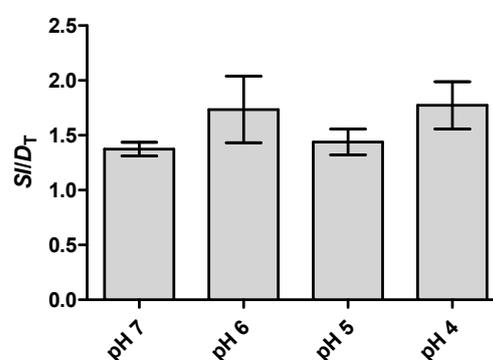


Figure 3. Sl/D values calculated from the survival curves of *G. stearothermophilus* STCC 4517 sporulated at 55 °C and heated in a media of different pHs.

The statistical analysis revealed that there were no significant differences between Sl/D_T values among different pHs. This finding seemed to indicate that both parameters were related and equally influenced by the pH of the treatment medium. These results showed that when calculating F_T^z values, the previously set out equation could be used (Ruiz *et al.*, 2021) regardless of the pH of the food product using an average value of Sl/D_T of 1.6.

Table 1. Heat resistance parameters at different pH for *G. stearothermophilus* esporulated at 55 °C.

pH	T (°C)	Sl (min) (SD)	D _T (min) (SD)	R ²	Sl/D _T (SD)
7	113	5.30 (0.44)	4.66 (0.40)	0.973	1.15 (0.16)
	116	3.22 (0.33)	2.22 (0.12)	0.984	1.45 (0.17)
	119	0.95 (0.06)	0.74 (0.10)	0.989	1.30 (0.16)
	121	0.78 (0.01)	0.49 (0.01)	0.997	1.60 (0.02)
6	110	6.6 (0.47)	5.20 (0.29)	0.976	1.17 (0.12)
	113	2.71 (0.05)	2.87 (0.12)	0.987	0.94 (0.03)
	116	2.01 (0.09)	1.11 (0.02)	0.978	1.82 (0.09)
	119	1.90 (0.90)	0.63 (0.02)	0.969	3.01 (1.47)
5	107	2.54 (0.17)	2.25 (0.08)	0.963	1.13 (0.05)
	110	1.16 (0.17)	1.15 (0.05)	0.978	1.02 (0.19)
	113	1.15 (0.15)	0.68 (0.04)	0.985	1.69 (0.13)
	116	0.84 (0.11)	0.44 (0.03)	0.978	1.92 (0.12)
4	107	0.71 (0.09)	0.95 (0.03)	0.994	0.74 (0.07)
	110	0.74 (0.03)	0.42 (0.01)	0.986	1.79 (0.11)
	113	0.52 (0.03)	0.19 (0.01)	0.956	2.74 (0.14)
	116	0.28 (0.01)	0.15 (0.01)	0.98	1.83 (0.13)

T, treatment temperature (°C); Sl, shoulder length (min); D_T, decimal reduction time (min); R², determination coefficient; SD, standard deviation.

Inactivation kinetics of *G. stearothermophilus* STCC 4517 sporulated at different temperatures

Bacterial spores can be present in raw food and may sporulate at different temperatures. This environmental factor may affect some properties of the spores formed and make them more resistant to food preservation technologies, so this point should be taken into account when optimising food processes.

It is well known that sporulation temperature changes some properties of the spores such as their heat resistance (Bressuire-Isoard *et al.*, 2018; Guizelini *et al.*, 2012; Minh *et al.*, 2011). Different authors have described the effect of sporulation temperature on thermal inactivation of spores (Condón *et al.*, 1992; González *et al.*, 1999; Leguerinel *et al.*,

2007) and they normally found that the higher the sporulation temperature, the greater the resistance the spores will have to heat (Carlin, 2011).

In this study, the thermal resistance of different spore suspensions of *G. stearothermophilus* STCC 4517 obtained at 45, 55 and 65 °C was studied in pH 7.0 medium at different treatment temperatures. The thermal resistance parameters obtained on fitting the survival curves to the Geraerd's equation are presented in Table 2. It includes D_T and Sl values, R², and Sl/D_T values. In all event the R² values were higher than 0.970 hence showing the goodness of fit for the model well represented the data.

As can be seen in Table 2, the shoulder phenomenon was observed in the survival curves obtained under all conditions

Table 2. Heat resistance parameters in McIlvaine citrate phosphate buffer of pH 7 for *G. stearothermophilus* sporulated at different temperatures.

ST (°C)	T (°C)	SI (min) (SD)	D _T (min) (SD)	R ²	SI/D _T (SD)
45	98	0.44 (0.02)	2.26 (0.10)	0.992	0.20 (0.02)
	101	0.87 (0.32)	0.92 (0.03)	0.992	0.94 (0.34)
	104	0.48 (0.28)	0.45 (0.13)	0.997	1.02 (0.30)
	107	0.14 (0.10)	0.23 (0.07)	0.995	0.76 (0.63)
55	113	5.30 (0.44)	4.66 (0.40)	0.973	1.15 (0.16)
	116	3.22 (0.33)	2.22 (0.12)	0.984	1.45 (0.17)
	119	0.95 (0.06)	0.74 (0.10)	0.989	1.30 (0.16)
	121	0.78 (0.01)	0.49 (0.01)	0.997	1.60 (0.02)
65	113	3.93 (1.21)	5.17 (0.46)	0.993	0.77 (0.28)
	116	1.36 (0.09)	2.50 (0.12)	0.994	0.54 (0.01)
	119	0.84 (0.34)	0.86 (0.22)	0.99	1.07 (0.61)
	121	0.56 (0.24)	0.70 (0.04)	0.97	0.80 (0.36)

ST, sporulation temperature (°C); T, treatment temperature (°C); SI, shoulder length (min); D_T, decimal reduction time (min); R², determination coefficient; SD, standard deviation.

studied. Additionally, shoulders and D_T values normally decreased as temperature increased, which concurs with the data presented above. From the data obtained in this research, sporulation temperature had a great effect on decimal reduction time values, with spores produced at 45 °C much less heat resistant than those formed at 55 and 65 °C. Therefore, the temperatures for treating spores that sporulated at 45 °C had to be reduced. Moreover, for purposes of comparison, the D₁₁₃ value was calculated from the DRTC. From the results obtained it can be concluded that there were no significant differences between the D₁₁₃ values calculated for the suspensions produced at 55 and 65 °C. However, the reduction of the sporulation temperature up to 45 °C led to a sharp fall in the D₁₁₃ value which was 100-fold approximately. Palop *et al.* (1999) observed similar changes in D₁₁₅ values for this specie when the sporulation temperature increased from 42 °C to 65 °C. The mechanism by which this temperature affects thermal inactivation is

as yet unknown. However some authors have proposed that this could be due to greater protoplast dehydration or to greater mineralization of the spores obtained at higher temperatures (Palop *et al.*, 1999). Some changes in the cortex peptidoglycan structure have also been observed when spores are produced at different temperatures (Melly *et al.*, 2002).

Figure 4A shows the DRTC of the spore suspensions of *G. stearothermophilus* STCC 4517 obtained at 45, 55 and 65 °C. As show in the figure, sporulation temperature hardly affected z values, which were 8.93 °C, 7.86 °C and 8.69 °C for 45 °C, 55 °C and 65 °C respectively. These values were not significantly different so the effect of treatment temperature on the thermal resistance of *G. stearothermophilus* STCC 4517 seems to have no relationship to sporulation temperature. This observation was made previously for other microorganisms such as *B. subtilis* (Condón and Sala, 1992) and

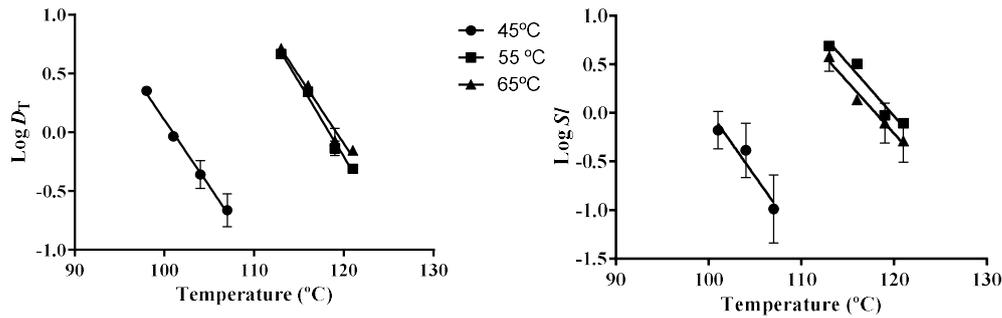


Figure 4. DRTC lines (A) and relationship between shoulder length and treatment temperature (B) of *G. stearotherophilus* sporulated at 45 (●), 55 (■) and 65 (▲) °C and heated in a media of pH 7.0.

B. licheniformis (Raso *et al.*, 1995). Bressuire-Isoard *et al.* (2018) proposed that as z values remained constant at different sporulation temperatures; this could indicate that the basic mechanism for heat inactivation does not depend on the sporulation temperature, even though structural changes may occur in the spores and different inactivation rates may be observed.

Despite the strives that have been made over the years to study different factors which can modify the resistance of bacterial spores to heat, there is no data on how they affect shoulder length. Thus, in this research, the effect of sporulation temperature on the shoulder length of *G. stearotherophilus* STCC 4517 was also studied.

In order to quantify this effect, the log SI vs. treatment temperature was plotted at each sporulation temperature (Figure 4B). As can be seen in figure 4B, an exponential relationship was also observed between shoulder length and treatment temperature in all cases. As with D_T values (Fig 4A), an increase in sporulation temperature from 45 °C to 55 °C produced a sharp increase in shoulder length. However, when sporulation temperature rose to 65 °C the

effect on shoulder length was less. As observed sporulation temperature did not affect the relationship between shoulder length and treatment temperature.

To evaluate the possible relationship between D_T and shoulder length (Figure 5), as indicated in the pH study, SI/D_T values were calculated for all sporulation temperatures (Figure 6). As observed in

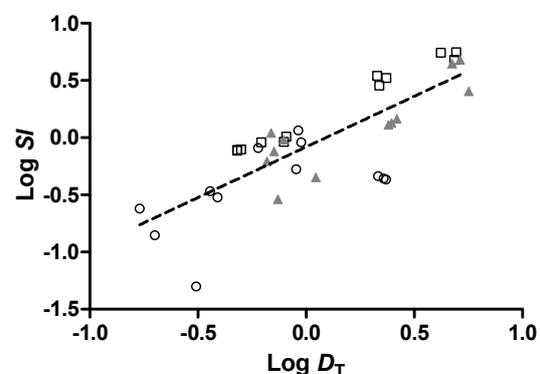


Figure 5. Correlation between Log D_T and Log SI values calculated for *G. stearotherophilus* STCC 4517 sporulated at 45 °C (○), 55 °C (□) and 65 °C (▲) heated in MacIlvaine buffer of pH 7.0.

figure 6 SI/D_T value calculated for sporulation temperature of 55 °C (1.39) was significantly ($p < 0.05$) bigger than those calculated for sporulation temperature of 45 °C (0.72) and 65 °C (0.76), which were not significantly different. This could indicate that at the

optimum sporulation temperature there might be a higher proportion of superdormant spores. Alternatively, assuming that shoulders may be linked to the damage repair phenomenon, the spores produced at the optimum growing temperature would have a greater capacity for damage repair. Since this point was considered of high relevance, the survival curves for all the bacterial spore suspensions, obtained at different temperatures, were also performed at all pHs (4.0, 5.0 and 6.0).

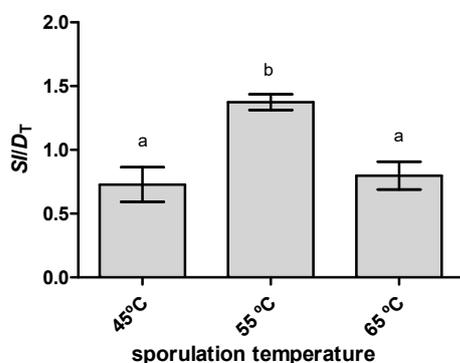


Figure 6. SI/D calculated for spore suspensions of *G. stearothermophilus* STCC 4517 sporulated at 45 °C, 55 °C and 65 °C and heated in McIlvaine pH 7.0.

Interaction between treatment pH and sporulation temperature in SI/D_T relationship.

The heat resistance at pH 4.0, 5.0 and 6.0 for the spore suspensions of *G. stearothermophilus* STCC 4517 obtained at 45 and 65 °C are presented in Tables 1 and 2 in annex 1.

For purposes of simplification and the conclusions drawn in this research more robust, a statistical analysis using multiple regression was performed; using the essential regression tool included with Microsoft Office Excel (Microsoft; Washington; USA). In this analysis, pH menstruum, sporulation temperature and

SI/D_T relation were considered. The quadratic equation which best described the results was the following (Eq. 4):

$$\frac{SI}{Dt} = -17.73 + 0.678 * ST + 0.346 * pH - 0.00618 * ST^2 - 0.00111 * ST * pH - 0.03145 * pH^2 \quad (\text{Eq. 4})$$

Where ST corresponds to sporulation temperature.

Figure 7A shows the surface response diagram obtained from fitting all results obtained in this research to equation 4 and figure 7B shows the correlation between predicted and observed values. This showed an R^2 of 0.91, $RMSE$ of 0.144 and values for the Bias factor (Bf) and accuracy factor (Af) of 1.04 and 1.01 respectively. The analysis of Figure 7A revealed that SI/D_T values, observed for the spores obtained at 45 °C were significantly higher at pH 4.0 than pH 7.0 though, no significant differences were observed for all other pHs. In case of spores obtained at 65 °C contrary behaviour was observed (i.e. SI/D_T values observed at pH 7.0 were significantly higher than those observed at pH 4.0) though, no significant differences were observed among pH 5.0, 6.0 and 7.0 neither pH 4.0, 5.0 and 6.0. This behaviour might be related with the differences produce by pH on damage and repair mechanisms or the activation kinetics. This is an interesting point which would might a deeper study.

On the other side, as also observed in the figure, sporulation temperature produced a much bigger effect on the relationship SI/DT than treatment medium pH. In the figure it can be also observed that the longest shoulders in all cases were observed for spores obtained at 55 °C (i.e. the optimal growth temperature for the bacterial spore species under study).

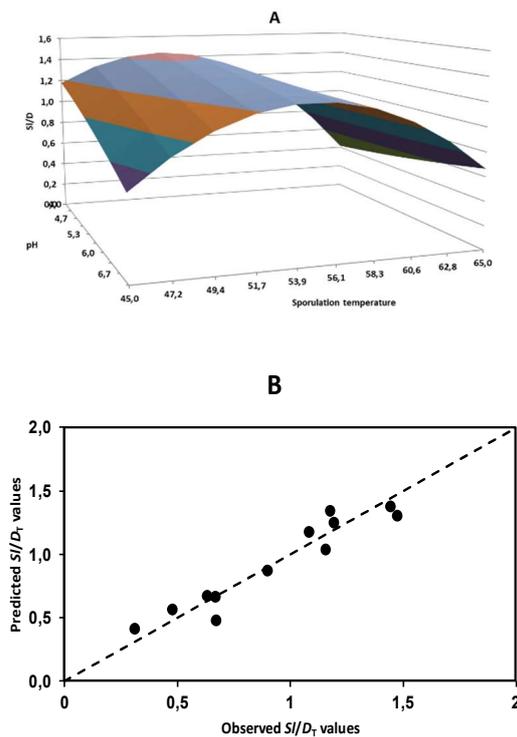


Figure 7. SI/D values for *G. stearothermophilus* STCC 4517 sporulated at different temperatures and treated at different pHs (A) and observed SI/D_T values obtained from the multiple regression (B). Table shows the statistical parameters of the multiple regression.

CONCLUSIONS

From the results obtained in this research it may be concluded that there is a relationship between shoulder length and the inactivation rate of the linear part of the survival curve; the effect treatment temperature has on this relationship is negligible.

It has also been observed that shoulder length and decimal reduction time decreases as the pH of the treatment media falls, but the relation between both is not affected by this variable for spores produced at the optimal growth temperature.

Sporulation temperature had a great impact on both shoulder length and the decimal reduction time for *G. stearothermophilus* STCC 4517; SI/D_T reached a maximum for spores produced at the optimal growth temperature.

From the results obtained, it can also be concluded that the new parameter proposed in our previous work (Ruiz *et al.*, 2021) would enable total treatment time to be recalculated in order to reach a desired inactivation level. This would take into account the shoulder length of the target microorganism, regardless of the desired treatment temperature and pH of the treatment matrix but it must be calculated with a spore suspension for the target microorganism obtained in light of its optimal growth conditions.

References

- Andre, S., Vallaey, T., Planchon, S. (2017). Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. *Research in Microbiology*. 168(4), 379-387. doi: 10.1016/j.resmic.2016.10.003
- Baril, E., Coroller, L., Couvert, O., Leguerinel, I., Postollec, F., Boulais, C., Carlin, F., Mafart, P. (2012). Modeling heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus licheniformis* spores as function of sporulation temperature and pH. *Food microbiology*. 30(1), 29-36. doi: 10.1016/j.fm.2011.09.017
- Bender, G. R., Marquis, R. E. (1985). Spore heat resistance and specific mineralization. *Applied and Environmental Microbiology*. 50(6), 1414-1421.
- Bressuire-Isoard, C., Broussolle, V., Carlin, F. (2018). Sporulation environment influences spore properties in *Bacillus*: evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms. *FEMS Microbiology Reviews*. 42(5), 614-626. doi: 10.1093/femsre/fuy021
- Cameron, M. S., Leonard, S. J., Barrett, E. L. (1980). Effect of moderately acidic pH on heat resistance of *Clostridium sporogenes* spores in phosphate buffer and in buffered pea puree. *Applied and Environmental Microbiology*. 39(5), 943-949.
- Carlin, F. (2011). Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food Microbiology*. 28(2), 177-182. doi: 10.1016/j.fm.2010.07.008
- Cebrián, G., Condón, S., Mañas, P. (2017). Physiology of the inactivation of vegetative bacteria by thermal treatments: Mode of action, influence of environmental factors and inactivation kinetics. *Foods*. 6(12), 107.
- Cerf, O. (1977). A review tailing of survival curves of bacterial spores. *Journal of Applied Bacteriology*. 42(1), 1-19.
- Condón-Abanto, S., Arroyo, C., Alvarez, I., Condón, S., Lyng, J. G. (2016). Application of ultrasound in combination with heat and pressure for the inactivation of spore forming bacteria isolated from edible crab (*Cancer pagurus*). *International Journal of Food Microbiology*. 223, 9-16. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.001

- Condón, S., Oria, R., Trepát, F. J. S. (1987). Heat-Resistance of Microorganisms - an Improved Method for Survival Counting. *Journal of Microbiological Methods*. 7(1), 37-44. doi: Doi 10.1016/0167-7012(87)90006-6
- Condón, S., Sala, F. J. (1992). Heat resistance of *Bacillus subtilis* in buffer and foods of different pH. *Journal of Food Protection*. 55(8), 605-608.
- Dawson, R., Elliot, D., Elliot, W., Jones, K. (1974). pH and buffers. Data for Biochemical Research: Clarendon Press, Oxford.
- Esteban, M. D., Huertas, J. P., Fernandez, P. S., Palop, A. (2013). Effect of the medium characteristics and the heating and cooling rates on the nonisothermal heat resistance of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores. *Food Microbiology*. 34(1), 158-163. doi: 10.1016/j.fm.2012.11.020
- Esty, J. R., Meyer, K. F. (1922). The heat resistance of the spores of *B. botulinus* and allied anaerobes XI. *Journal of Infectious Diseases*. 31, 650-663. doi: DOI 10.1093/infdis/31.6.650
- Gaillard, S., Leguérinel, I., Mafart, P. (1998). Modelling combined effects of temperature and pH on the heat resistance of spores of *Bacillus cereus*. *Food microbiology*. 15(6), 625-630.
- Garcia, D., van der Voort, M., Abee, T. (2010). Comparative analysis of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores obtained at different temperatures. *International journal of food microbiology*. 140(2-3), 146-153. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.005
- Geeraerd, A. H., Herremans, C. H., Van Impe, J. F. (2000). Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*. 59(3), 185-209.
- Geeraerd, A. H., Valdramidis, V. P., Van Impe, J. F. (2005). GlnaFit, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology*. 102(1), 95-105. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.038
- González, I., Lopez, M., Martínez, S., Bernardo, A., González, J. (1999). Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores formed at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology*. 51(1), 81-84.
- Gould, G. W., Dring, G. J. (1975). Heat resistance of bacterial endospores and concept of an expanded osmoregulatory cortex. *Nature*. 258(5534), 402-405. doi: 10.1038/258402a0
- Guizelini, B. P., Vandenbergh, L. P. S., Sella, S. R. B. R., Soccol, C. R. (2012). Study of the influence of sporulation conditions on heat resistance of *Geobacillus stearothermophilus* used in the development of biological indicators for steam sterilization. *Archives of Microbiology*. 194(12), 991-999. doi: 10.1007/s00203-012-0832-z
- Iciek, J., Papiewska, A., Molska, M. (2006). Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores during thermal processing. *Journal of Food Engineering*. 77(3), 406-410. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.07.005
- Leguerinel, I., Couvert, O., Mafart, P. (2007). Modelling the influence of the sporulation temperature upon the bacterial spore heat resistance, application to heating process calculation. *International journal of food microbiology*. 114(1), 100-104. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.035
- Leguerinel, I., Mafart, P. (2001). Modelling the influence of pH and organic acid types on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. *International journal of food microbiology*. 63(1-2), 29-34. doi: Doi 10.1016/S0168-1605(00)00394-9
- Lindsay, J. A., Barton, L. E., Leinart, A. S., Pankratz, H. S. (1990). The effect of sporulation temperature on sporal characteristics of *Bacillus subtilis* A. *Current Microbiology*. 21(1), 75-79.
- López, M., González, I., Condón, S., Bernardo, A. (1996). Effect on pH heating medium on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *International Journal of Food Microbiology*. 28(3), 405-410.
- Mallidis, C. G., Frantzeskakis, P., Balatsouras, G., Katsaboxakis, C. (1990). Thermal-Treatment of Aseptically Processed Tomato Paste. *International Journal of Food Science and Technology*. 25(4), 442-448.
- Mañas, P., Pagán, R. (2005). Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology*. 98(6), 1387-1399. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02561.x
- Melly, E., Genest, P. C., Gilmore, M. E., Little, S., Popham, D. L., Driks, A., Setlow, P. (2002). Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures. *Journal of Applied Microbiology*. 92(6), 1105-1115. doi: DOI 10.1046/j.1365-2672.2002.01644.x
- Minh, H. N. T., Durand, A., Loison, P., Perrier-Cornet, J. M., Gervais, P. (2011). Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 90(4), 1409-1417. doi: 10.1007/s00253-011-3183-9
- Okereke, A., Beelman, R. B., Doores, S., Walsh, R. (1990). Elucidation of the Mechanism of the Acid-blanch and EDTA Process Inhibition of *Clostridium sporogenes* PA 3679 Spores. *Journal of Food Science*. 55(4), 1137-1142.
- Palop, A., Mañas, P., Condón, S. (1999). Sporulation temperature and heat resistance of *Bacillus* spores: a review. *Journal of Food Safety*. 19(1), 57-72.
- Palop, A., Raso, J., Pagán, R., Condón, S., Sala, F. J. (1996). Influence of pH on heat resistance of *Bacillus licheniformis* in buffer and homogenised foods. *International Journal of Food Microbiology*. 29(1), 1-10.
- Palop, A., Raso, J., Pagán, R., Condón, S., Sala, F. J. (1999). Influence of pH on heat resistance of spores of *Bacillus coagulans* in buffer and homogenized foods. *International Journal of Food Microbiology*. 46(3), 243-249.
- Palop, A., Sala, F. J., Condón, S. (1999). Heat resistance of native and demineralized spores of *Bacillus subtilis* sporulated at different temperatures. *Appl Environ Microbiol*. 65(3), 1316-1319.
- Periago, P. M., Fernandez, P. S., Salmeron, M. C., Martinez, A. (1998). Predictive model to describe the combined effect of pH and NaCl on apparent heat resistance of *Bacillus stearothermophilus*. *International Journal of Food Microbiology*. 44(1-2), 21-30.
- Planchon, S., Dargaignaratz, C., Levy, C., Ginies, C., Broussolle, V., Carlin, F. (2011). Spores of *Bacillus cereus* strain KBAB4 produced at 10 degrees C and 30 degrees C display variations in their properties. *Food microbiology*. 28(2), 291-297. doi: 10.1016/j.fm.2010.07.015
- Pontius, A. J., Rushing, J. E., Foegeding, P. M. (1998). Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as affected by various pH values and organic acids. *J Food Protect*. 61(1), 41-46. doi: Doi 10.4315/0362-028x-61.1.41
- Raso, J., Pagán, R., Condón, S., Sala, F. J. (1998). Influence of temperature and pressure on the lethality of ultrasound. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(2), 465-471.
- Raso, J., Palop, A., Bayarte, M., Condón, S., Sala, F. J. (1995). Influence of Sporulation Temperature on the Heat-Resistance of a Strain of *Bacillus Licheniformis* (Spanish Type Culture Collection-4523). *Food Microbiology*. 12(5), 357-361. doi: Doi 10.1016/S0740-0020(95)80116-2
- Rigaux, C., Denis, J. B., Albert, I., Carlin, F. (2013). A meta-analysis accounting for sources of variability to estimate heat resistance reference parameters of bacteria using hierarchical Bayesian modeling: estimation of D at 121.1 C and pH 7, zT and zpH of *Geobacillus stearothermophilus*. *International Journal of Food Microbiology*. 161(2), 112-120.
- Ruiz, V., Alonso, R., Salvador, M., Condón, S., Condón-Abanto, S. (2021). Impact of shoulders on the calculus of heat sterilization treatments with different bacterial spores. *Food Microbiology*. 94, 103663. doi: 10.1016/j.fm.2020.103663
- Sala, F. J., Ibarz, P., Palop, A., Raso, J., Condón, S. (1995). Sporulation Temperature and Heat-Resistance of *Bacillus subtilis* at Different Ph Values. *Journal of Food Protection*. 58(3), 239-243. doi: Doi 10.4315/0362-028x-58.3.239
- Samapundo, S., Heyndrickx, M., Xhaferi, R., Devlieghere, F. (2011). Validated empirical models describing the combined effect of water activity and pH on the heat

resistance of spores of a psychrotolerant *Bacillus cereus* strain in broth and Béchamel sauce. *Journal of Food Protection*. 74(10), 1662-1669.

ANEX I

Table 1. Heat resistance parameters for *G. stearothermophilus* sporulated at 45°C in McIlvaine buffer at pH 6, 5 and 4.

pH	T ^a (°C)	SI (SD)	D _T (SD)	R ²	SI/D _T (SD)
6	95	2.27 (0.57)	2.44 (0.11)	0.995	0.94 (0.27)
	98	1.34 (0.08)	1.16 (0.03)	0.991	1.15 (0.09)
	101	0.49 (0.06)	0.52 (0.01)	0.994	0.95 (0.13)
	104	0.30 (0.05)	0.23 (0.03)	0.994	1.29 (0.17)
5	92	1.75 (0.34)	1.33 (0.07)	0.993	1.33 (0.33)
	95	0.99 (0.10)	0.74 (0.05)	0.991	1.35 (0.11)
	98	0.57 (0.06)	0.37 (0.02)	0.996	1.52 (0.20)
	101	0.26 (0.02)	0.19 (0.03)	0.995	1.38 (0.10)
4	89	1.02 (0.28)	1.26 (0.02)	0.994	0.81 (0.23)
	92	0.69 (0.13)	0.79 (0.02)	0.985	0.87 (0.17)
	95	0.61 (0.02)	0.45 (0.01)	0.974	1.36 (0.06)
	98	0.61 (0.16)	0.29 (0.01)	0.989	2.10 (0.58)

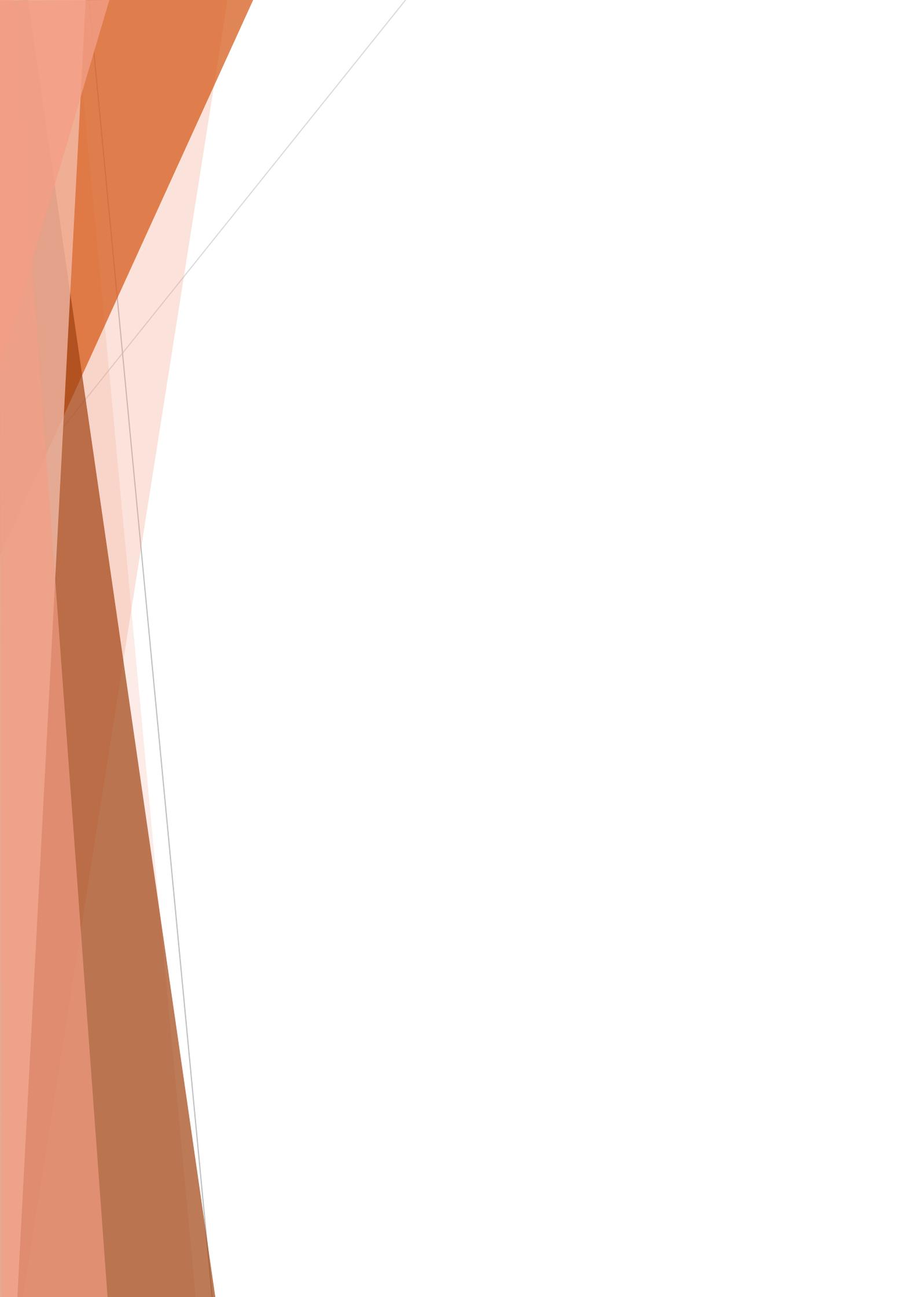
T, treatment temperature (°C); SI, shoulder length (min); D_T, decimal reduction time (min); R², determination coefficient; SD, standard deviation.

Table 2. Heat resistance parameters for *G. stearothermophilus* sporulated at 65°C in McIlvaine buffer at pH 6, 5 and 4.

pH	T ^a (°C)	SI (SD)	D _T (SD)	R ²	SI/D _T (SD)
6	110	4.54 (0.13)	11.09 (0.65)	0.996	0.41 (0.01)
	113	2.30 (0.99)	4.51 (1.20)	0.993	0.55 (0.34)
	116	1.92 (0.03)	2.04 (0.14)	0.996	0.95 (0.05)
	119	0.39 (0.03)	1.00 (0.06)	0.994	0.39 (0.03)
5	107	4.33 (0.63)	6.49 (0.40)	0.995	0.67 (0.14)
	110	2.27 (0.21)	3.51 (0.25)	0.991	0.65 (0.09)
	113	1.60 (0.09)	1.71 (0.04)	0.994	0.93 (0.07)
	116	0.87 (0.10)	0.88 (0.07)	0.994	0.99 (0.15)
4	104	1.21 (0.51)	4.37 (0.19)	0.985	0.28 (0.12)
	107	0.45 (0.26)	3.13 (0.45)	0.974	0.14 (0.06)
	110	0.73 (0.49)	1.70 (0.19)	0.989	0.41 (0.26)
	113	0.95 (0.32)	0.95 (0.32)	0.994	0.56 (0.22)

T, treatment temperature (°C); SI, shoulder length (min); D_T, decimal reduction time (min); R², determination coefficient; SD, standard deviation.

4.3. Activación de esporos de *G. stearothermophilus*



Como se comentó en la introducción, un problema importante de la presencia de esporos en los alimentos, además de su elevada resistencia, es la presencia de esporos superlatentes que podrían sobrevivir al tratamiento y empezar a crecer a lo largo de la vida útil del producto. Esto supone un inconveniente tanto económico, los alimentos se pueden deteriorar como consecuencia de la multiplicación de células alterantes, como sanitario, algunas especies esporuladas son patógenas, por lo que su germinación y posterior crecimiento en el alimento puede ocasionar problemas de salud en los consumidores. Es por ello, que resulta importante conocer los mecanismos que conducen a la activación y/o germinación de los esporos superlatentes, con el fin de ser capaces de garantizar también el control de esta fracción de esporos, durante los tratamientos de conservación de alimentos.

Es importante destacar que, de forma habitual se considera espora superlatente a aquel que o no es capaz de germinar en presencia de nutrientes o requiere de mucho más tiempo para hacerlo. Sin embargo, también se ha descrito la aparición de esporos superlatentes frente a otros tratamientos como el Ca-DPA o la dodecilamina (Zhang y Mathys, 2018). Cabe señalar que la presencia de esporos con dificultades para germinar en diferentes condiciones podría suponer una estrategia de supervivencia para la población, por lo que es previsible poder encontrar varias fracciones de esporos, capaces de germinar en diferentes circunstancias, en una misma suspensión de esporos.

En la actualidad, no se conocen las diferencias entre los esporos latentes y superlatentes, ni si se debe a diferencias estructurales importantes o si podría ser debido a cambios más sutiles como la presencia/ausencia de determinados receptores.

Esta parte de la investigación se inició con el fin de caracterizar el fenómeno de activación de los esporos superlatentes y aportar datos sobre su cinética.

Para llevar a cabo este estudio se seleccionó *G. stearothermophilus*, ya que como se observó en el capítulo 4.2., fue la especie que mostró una relación SI/D_T superior, de 1,4 de media. Además, al contrario de lo observado en las otras cuatro especies, estos hombros tan prolongados parecían involucrar un incremento en el recuento en placa, indicativo de posibles fenómenos de activación de esporos superlatentes presentes en la suspensión. Se decidió estudiar con más detalle el fenómeno de activación por calor, ya que se trata de la tecnología más empleada a nivel industrial y de explorar el efecto de otras tecnologías y/o compuestos sobre los que apenas existen referencias.

Es importante tener en cuenta que se utilizó el aumento del recuento en placa como método de detección de la activación de los esporos superlatentes, lo cual implica que realmente se están detectando los esporos activados, que han adquirido la capacidad de germinar en un medio rico en nutrientes.

4.3.1. Activación con calor

La activación de los esporos superlatentes por el calor es conocida desde hace años; de hecho, son muchas las investigaciones que introducen un paso preliminar de activación a temperaturas subletales antes de las posteriores determinaciones de termorresistencia. De estos tratamientos a temperaturas subletales pueden hacerse en ocasiones algunas deducciones cinéticas, pero en general presentan el inconveniente de que el rango de temperaturas de activación es muy escaso y siempre existe la duda de si alguna de las temperaturas más altas es en realidad letal.

Existen otros modelos diseñados para describir curvas de supervivencia y calcular tratamientos térmicos industriales que asumen una cinética exponencial de activación pero en realidad su objetivo resta importancia a estas cinéticas de activación; en definitiva, son modelos que como el nuestro, descrito en el apartado anterior, tienen una finalidad práctica, el cálculo de los tratamientos, y restan importancia al fenómeno de activación en su aspecto científico que es el que abordamos en este apartado.

La Figura 4.3.1 muestra las gráficas de supervivencia al calor de *G. stearothermophilus* a cuatro temperaturas obtenidas a pH 7,0. Como se puede observar en las mismas, y como se ha discutido en el capítulo 4.2, se produjo un marcado fenómeno de hombro, que era consecuencia, al menos parcialmente, de un incremento en el recuento, debido, previsiblemente, a la activación de los esporos superlatentes presentes en la suspensión.

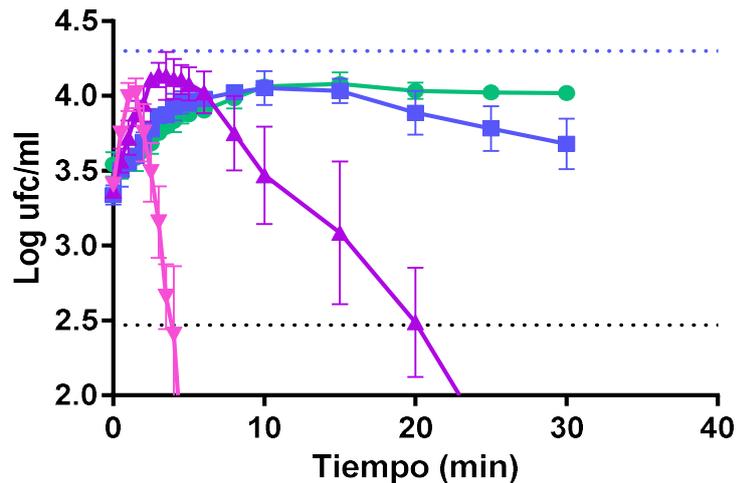


Figura 4.3.1. Curvas de supervivencia de *G. stearothermophilus* obtenidas a pH 7 a las siguientes temperaturas: 107 °C (●), 110 °C (●), 115 °C (▲) y 120 °C (▲). La línea discontinua azul marca el recuento máximo esperable, estimado mediante recuento microscópico total de esporos y la línea discontinua negra marca el límite de detección de la técnica.

Como se puede apreciar en la figura 4.3.1., la activación observada, es decir, el recuento máximo obtenido, fue similar a las cuatro temperaturas estudiadas. Sin embargo, el tiempo al que se obtenía dicho recuento máximo fue diferente en cada caso, siendo más rápido a mayor temperatura.

Para abordar el estudio de la implicación de la activación en la interpretación del perfil de este tipo de gráficas, nuestra primera necesidad fue seleccionar/diseñar un modelo matemático adecuado.

4.3.1.1. Selección de un modelo matemático para describir la cinética de activación

Existe en la bibliografía una variedad de modelos matemáticos que son capaces de describir las gráficas de supervivencia en las que se encuentran fenómenos de hombro por activación. Es decir, en los primeros momentos de tratamiento el recuento, en vez de disminuir, aumenta hasta llegar a cierto nivel, para después comenzar la inactivación a un ritmo exponencial. Este tipo de perfil de las gráficas de supervivencia se cree que se deben a la activación de esporos superlatentes (Corradini y col., 2010), que en condiciones normales no son capaces de germinar, pero que durante el tratamiento térmico adquieren la capacidad de germinar y formar colonias en placa.

Existen diversos modelos matemáticos que se han desarrollado para describir las gráficas de supervivencia con hombros de distintos perfiles, por lo que fue preciso seleccionar aquellos más adecuados para nuestros propósitos.

1. Modelos de Rodriguez y col. (1991) y Sapru y col. (1992)

Estos dos modelos fueron desarrollados por un mismo grupo de investigación por lo que la mayoría de las asunciones son comunes. Los autores asumen (Figura 4.3.2) que dentro de la población (N_1) coexisten esporos en distintos estados fisiológicos: esporos latentes, capaces de formar colonias en un medio adecuado, y esporos superlatentes incapaces de hacerlo. Al aplicar un tratamiento térmico se producirían simultáneamente los siguientes procesos: muerte de los microorganismos latentes (N_3), activación de los esporos superlatentes (N_2) y muerte de los esporos activados (N_4). Estas tres transformaciones seguirían cinéticas de primer orden cuya velocidad vendría definida por las constantes: D_1 , relativa a la muerte de los esporos latentes; A , relativa a la activación de los superlatentes; y D_2 , relativa a la muerte de los esporos activados. El modelo de Rodríguez asume que las constantes de inactivación de D_1 y D_2 son iguales -es decir que los esporos activados y latentes tienen la misma termorresistencia-, mientras que el de Sapru y col. (1992) asume que tanto A , como D_1 y D_2 son independientes, concomitantes y de primer orden. Las ecuaciones de los modelos se basan en la resolución de ecuaciones diferenciales con N_1 y N_2 como variables principales. Las ecuaciones de cada modelo se indican en la Tabla 4.3.1.

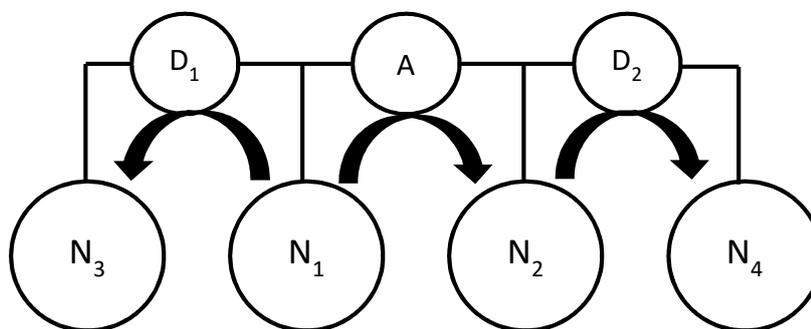


Figura 4.3.2. Diagrama de los modelos de Rodriguez y col. (1991) y Sapru y col. (1992). N representa las distintas poblaciones y A , D_1 y D_2 las constantes de transformación.

2. Modelo de Iciek y col. (2000)

Este modelo fue desarrollado para el ajuste de las curvas de supervivencia de *G. stearothermophilus* en las que, además de fenómenos de hombro debidos a la activación, se encontraban fenómenos de cola, que los autores también achacaban a ese mismo fenómeno. Iciek y col (2000) asumen (Figura 4.3.3) que en la población coexisten esporos latentes (N_1) y superlatentes (N'_1), pero a diferencia de los autores del apartado anterior creen que ambos tipos de esporos deben activarse (N_2) antes de morir (N_3). Según ellos, las constantes de activación de los latentes (K_a) y de los superlatentes (K'_a) son diferentes, pero una vez activados por el calor ambos mostrarían la misma termorresistencia (K_d). Estas asunciones plantean algunas preguntas: ¿Qué diferencia hay entre un esporo latente y un esporo latente activado? Y ¿Cómo demostrar esa diferencia? Sin embargo, estas asunciones tienen la ventaja de que permiten justificar con un mismo fenómeno, la activación, tanto los hombros como las colas. Los hombros se deberían a la activación de los esporos latentes.

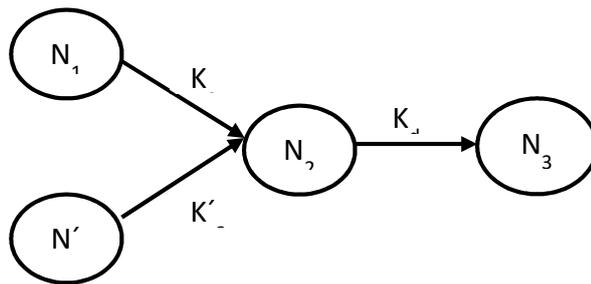


Figura 4.3.3. Diagrama del modelo de Iciek y col. (2000).

En la Tabla 4.3.1 se muestran las ecuaciones de los distintos modelos empleados.

Tabla 4.3.1. Ecuaciones de los modelos objeto de estudio.

Modelo	Ecuación
Sapru (1992)	$N_2(t) = N_{20} \cdot e^{K_d t} + \left[\frac{K_a}{K_a + K_d1 + K_d2} \right] \cdot N_{10} \cdot (1 - e^{-(K_a + K_d1 - K_d2) \cdot t}) \cdot e^{-K_d2 \cdot t}$
Rodríguez (1991)	$N(t) = N_{30} \cdot e^{(-K_d3 \cdot t)} + N_{10} \cdot [1 - e^{(-K_a \cdot t)}] + N_{20} \cdot e^{(-K_d \cdot t)}$
Iciek (2000)	$\frac{N}{(N_2)_0} = e^{-K_d t} + \frac{(N_1)_0}{(N_2)_0} \cdot \frac{K_a}{K_a - K_d} [e^{-K_d t} - e^{-K_a t}] + \frac{(N'_1)_0}{(N_2)_0} \cdot \frac{K'_a}{K'_a - K_d} [e^{-K_d t} - e^{-K'_a t}]$

Hay que tener en cuenta que estos modelos se desarrollaron con la finalidad de afinar los cálculos de los tratamientos térmicos utilizados en la industria conservera, es decir para predecir los tiempos de tratamiento necesarios para conseguir varios ciclos de inactivación. En principio, como se ve en la Figura 4.3.4, por ejemplo, comparando los tiempos necesarios para reducir el recuento a 2,5 log ufc/ml, los tres modelos serían muy adecuados para este propósito. Sin embargo, en esta investigación lo importante no es esa predicción, sino también describir los fenómenos fisiológicos que tiene lugar, como la activación de la fracción de superlatentes, a través del ritmo de crecimiento del recuento. La Figura 4.3.4 muestra claramente que los modelos de Rodríguez et al. (1991) y de Sapru et al. (1992) son menos adecuados para este propósito.

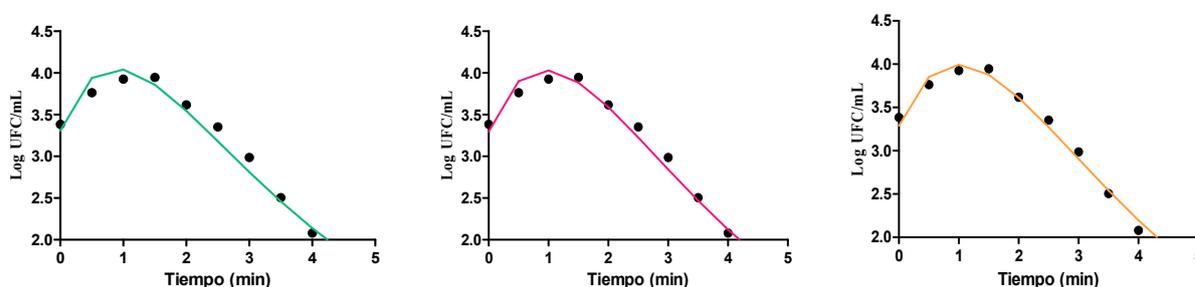


Figura 4.3.4. Curvas de supervivencia de *G. stearothermophilus* tratado a 120 °C y pH 7,0. Los puntos muestran los resultados experimentales y las líneas las predicciones estimadas con los modelos de: Rodríguez y col. (1991) en verde, Sapru y col. (1992) en rosa e Iciek y col. (2000) en naranja.

En el modelo de Iciek y col. (2000) la predicción que aparece en la figura es aparentemente buena, pero poco fiable ya que asume que las dos subpoblaciones de esporos, latentes y superlatentes, se activan y el hombro inicial puede ser un artefacto del modelo que suma las activaciones de ambas poblaciones. Esta asunción hace poco fiable la estimación de la cinética de activación de la fracción de superlatentes, que es la que realmente nos interesa en esta investigación. Por otra parte, asume que la activación de los superlatentes dará lugar a la aparición de colas, que no es nuestro caso. De hecho, si se observa la predicción de este modelo se apreciará que la zona de declive no es totalmente recta, como sería esperable, sino que tiende a describir el inicio de una cola. Dado que nuestro interés se centraba en estudiar la cinética de activación de la fracción de superlatentes, decidimos desarrollar un modelo más adecuado.

A nuestro entender un defecto común a estos tres modelos es que no asumen la existencia de fenómenos de daño y recuperación celular, que también producen retrasos en el inicio del curso de inactivación exponencial (aunque nunca inducen un aumento del recuento). Los fenómenos de daño y recuperación celular, así como su implicación en la aparición de “hombros planos” está bien documentado tanto en células vegetativas como en esporos bacterianos.

Para desarrollar nuestro modelo decidimos asumir, como en los tres anteriores, que existían dos fracciones de esporos: latentes y superlatentes, que los superlatentes se transformaban en latentes como consecuencia de la activación térmica, y que las cinéticas de muerte y activación seguían un curso exponencial; pero además asumimos que en los instantes previos a la destrucción por el calor se producían daños subletales, pero no mortales, en las células. La Figura 4.3.5 esquematiza el proceso.

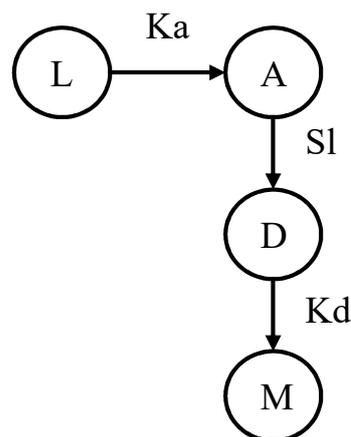


Figura 4.3.5. Diagrama del modelo propuesto para una población de esporos expuesta a un tratamiento térmico letal. *L*: población de esporos superlatentes, *A*: población activada por el calor, *D*: población dañada por el tratamiento térmico, *M*: población inactivada por el tratamiento.

La contribución de la población latente al perfil de la curva de supervivencia se despreció, dado que esta fracción representaba tan solo el 10% de la población inicial. Por tanto, como se muestra en el diagrama la población de esporos superlatentes (*L*) se transformaría en esporos activados (*A*) a un ritmo definido por la constante de activación (K_a). Los esporos activados se dañarían (*D*) lo que daría lugar a la aparición de un hombro plano de una duración Sl . Finalmente, los esporos dañados se destruirían (*M*) a un ritmo definido por la constante de inactivación K_d .

Existe ya un modelo muy adecuado y bien contrastado para describir el paso de A a M considerando la existencia de un daño previo, el modelo de Geeraerd y col. (2000). Una pequeña dificultad del modelo de Geeraerd es que utiliza logaritmos neperianos para los cálculos, lo que dificulta la comparación de las constantes obtenidas en el ajuste con la mayoría de las existentes en la bibliografía. Por ello, tal y como ha discutido Peleg (2002) se decidió transformar la fórmula original en la equivalente en logaritmos decimales. Esta transformación es muy corriente en nuestros días, por ejemplo, se ha hecho para describir las curvas de supervivencia. La ecuación de Geeraerd transformada sería:

$$\text{Log } N = \text{Log}10 (N_0 * 10^{(-Kd*t)}) * (10^{(Kd*SL)}) / (1 + (10^{(Kd*SL)} - 1) * 10^{(-Kd*t)}) \quad \text{Ecuación 4.3.1}$$

Esta ecuación no permite modelizar el aumento de recuento observado ya que no considera la activación de los esporos superlatentes. El número de esporos activados vendría descrito por la ecuación:

$$N_0 = A_0 + L_0 - L_0 * 10^{(-Ka*t)} \quad \text{Ecuación 4.3.2}$$

Incluyendo la Ecuación 4.3.2 en la de Geeraerd transformada obtendríamos la Ecuación 3, que es la expresión matemática de nuestro modelo.

$$\text{Log } N = \text{Log}10 ((A_0 + L_0 - L_0 * 10^{(-Ka*t)}) * 10^{(-Kd*t)}) * (10^{(Kd*SL)}) / (1 + (10^{(Kd*SL)} - 1) * 10^{(-Kd*t)}) \quad \text{Ecuación 4.3.3}$$

El ajuste de la predicción de nuestro modelo a una curva que hemos utilizado como referencia se incluye en la Figura 4.3.6.

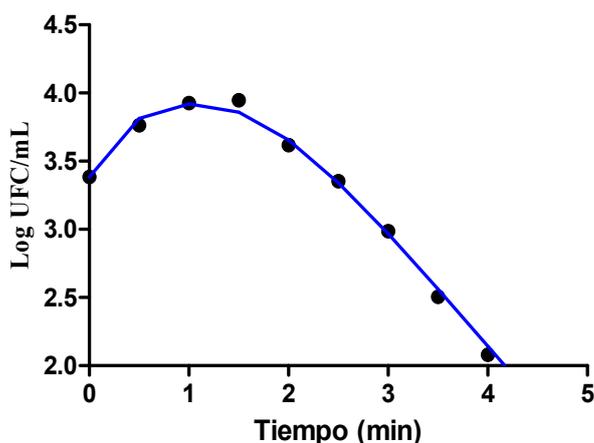


Figura 4.3.6. Curvas de supervivencia de *G. stearothermophilus* tratado a 120°C y pH 7. Los puntos muestran los resultados experimentales y la línea azul la predicción estimada con el modelo desarrollado en este trabajo.

La Figura 4.3.7 compara directamente los valores experimentales frente a los predichos por los cuatro modelos. Como se observa en la Figura, en los tres modelos comparados siempre existe una curvatura de mayor o menor intensidad, mientras que en el modelo que proponemos no se observa. Además, los parámetros de bondad de los ajustes son mejores con el modelo propuesto en esta investigación (Tabla 4.3.2). En cualquier caso, la mayor precisión de las predicciones no es lo más importante, sino la mayor fiabilidad de las constantes de activación que permite deducir, y sobre todo que tiene una base biológica mucho más sólida que los otros tres modelos, lo que le confiere mayor robustez.

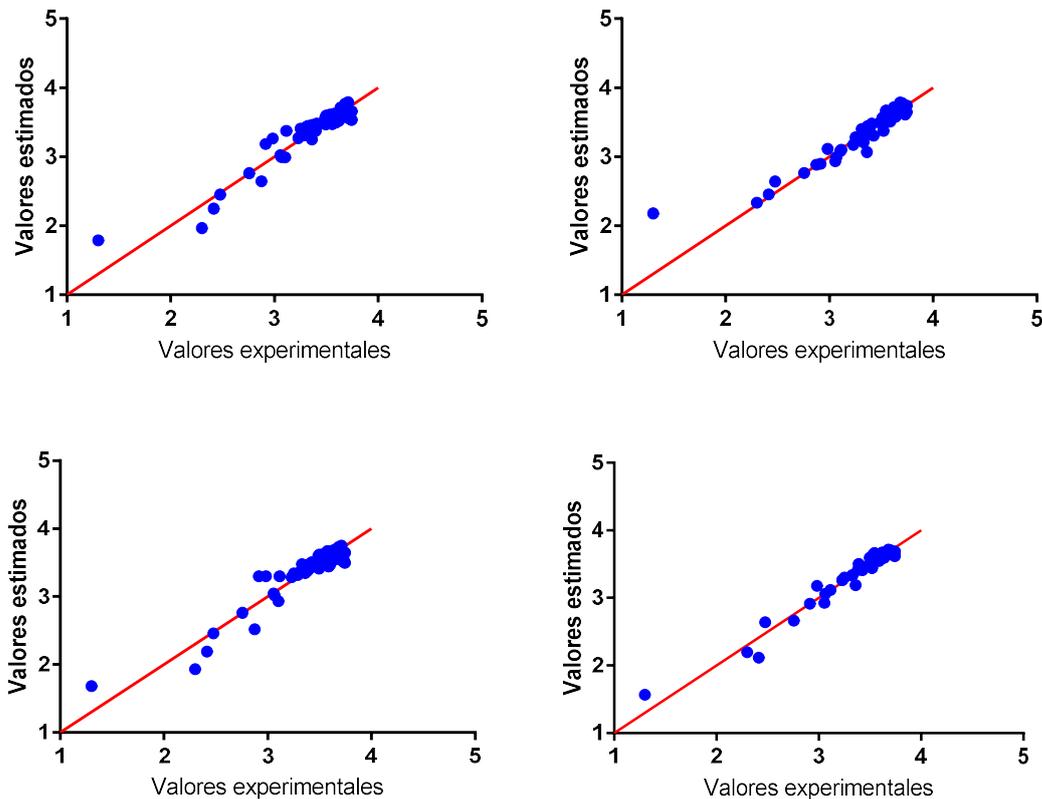


Figura 4.3.7. Comparación entre valores observados experimentalmente y estimados por los cuatro modelos: (A) Rodríguez y col. (1991), (B) Sapru y col. (1992) y (C) Iciek y col. (2000) y (D) Modelo propuesto.

Tabla 4.3.2. Bondad de los ajustes con los cuatro modelos. Coeficiente de determinación, error cuadrático medio, factor de sesgo (*Bf*, biass factor) y factor de exactitud (*Af*, accuracy factor). Media de tres réplicas de datos obtenidos a 110 °C y otras tres réplicas a 115 °C (en total 6 determinaciones) en tampón McIlvaine pH 7.

<i>Modelo</i>	<i>R</i> ²	<i>RMSE</i>	<i>Bf</i>	<i>Af</i>	<i>Índice exactitud</i>
<i>Rodríguez</i>	0,942	0,110	1,003	1,003	0,344
<i>Sapru</i>	0,960	0,097	1,003	1,002	0,238
<i>Iciek</i>	0,935	0,122	1,000	1,003	0,328
<i>Nuevo</i>	0,965	0,077	1,001	1,002	0,175

Por otro lado, es importante destacar que, como se ha discutido anteriormente, en el tratamiento térmico de esporos no solo aparecen hombros de activación, sino que también pueden aparecer fenómenos de hombro plano debidos a fenómenos de daño y reparación, por lo que es importante emplear un modelo que permita ajustar todos los tipos de gráficas de supervivencia. Para estudiar el comportamiento de estos modelos en gráficas de supervivencia con fenómenos de hombro plano en lugar de hombros de activación, se empleó *Brevibacillus choshinensis*, puesto que en esta especie se había observado la presencia de este tipo de perfil cinético. La Figura 4.3.8 muestra el ajuste con los cuatro modelos, a las curvas de supervivencia obtenidas a 107 °C, en tampón de pH 7,0.

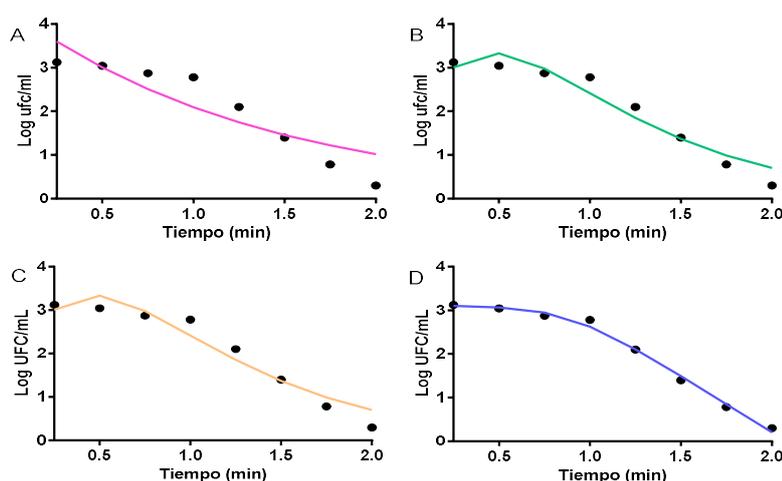


Figura 4.3.8. Datos experimentales de *Brevibacillus choshinensis* a 107 °C en tampón McIlvaine a pH 7,0 ajustados con las ecuaciones de: A: Sapru y col. (1992); B: Rodríguez y col. (1991); C: Iciek y col. (2000) y D: modelo propuesto en este trabajo. Datos obtenidos en otro estudio realizado por el grupo de investigación.

Como se puede observar en la Figura 4.3.8, el modelo desarrollado en este trabajo también resultó adecuado en el ajuste de datos experimentales en los que aparecían fenómenos de hombro plano, previsiblemente derivados de fenómenos de daño y reparación. Por el contrario, los modelos obtenidos de la bibliografía no fueron adecuados para el ajuste de este tipo de hombros. La nueva ecuación, que describe ambos tipos de hombros basándose en asunciones relacionadas con fenómenos fisiológicos celulares, supone una gran ventaja respecto a estas ecuaciones, por lo que fue la seleccionada para el ajuste de los datos de esta investigación.

4.3.1.3. Efecto de la temperatura de tratamiento en la activación e inactivación de *G. stearothermophilus*

Una vez seleccionado el modelo matemático a emplear, se obtuvieron y modelizaron las curvas de supervivencia obtenidas a varias temperaturas. Los datos se obtuvieron a tres pH diferentes con objeto de obtener una visión más amplia del fenómeno de activación térmica. Los datos experimentales se obtuvieron procurando muestrear adecuadamente los primeros momentos del tratamiento para describir con la mayor precisión posible la fase de activación.

Los parámetros obtenidos se muestran en la Tabla 4.3.3., y corresponden a entre dos y seis réplicas por condición experimental. El modelo ajustó adecuadamente los datos experimentales en la gran mayoría de los casos, con valores R^2 comprendidos entre 0,71 y 0,99.

Tabla 4.3.3. Efecto de la temperatura y el pH en la cinética de activación e inactivación de esporos de *G. stearothermophilus*.

pH	Temperatura (°C)	K_a	K_d	SI	K_d/K_a	R^2 mínimo	$RMSE$ máximo
7,0	110	0,048±0,024	0,035±0,015	3,657±4,352	0,910±0,620	0,923	0,067
	115	0,106±0,021	0,184±0,056	4,195±1,790	1,829±0,738	0,794	0,160
	117,5	0,146±0,057	0,370±0,031	3,562±0,329	2,711±0,855	0,934	0,162
	120	0,180±0,005	0,854±0,049	1,670±0,212	4,756±0,145	0,962	0,090
5,5	110	0,008±0,001	0,087±0,022	13,356±2,529	11,187±3,609	0,881	0,100
	115	0,052±0,030	0,177±0,103	2,437±2,451	4,213±2,601	0,707	0,098
	117,5	0,055±0,001	0,521±0,183	2,874±0,075	9,498±3,483	0,990	0,061
	120	0,070±0,026	1,062±0,222	1,514±0,342	15,682±2,635	0,996	0,059
4,0	105	0,016±0,005	0,124±0,033	10,947±3,426	8,677±4,748	0,980	0,059
	107	0,027±0,026	0,162±0,026	7,383±2,159	6,472±2,472	0,966	0,143
	110	0,096±0,032	0,294±0,070	2,621±1,368	3,247±0,985	0,932	0,181
	115	0,273±0,121	1,040±0,078	1,236±0,074	4,696±3,067	0,982	0,125

Para facilitar la interpretación de los datos obtenidos, se representó la relación entre las constantes de activación e inactivación con la temperatura de tratamiento para los tres pHs.

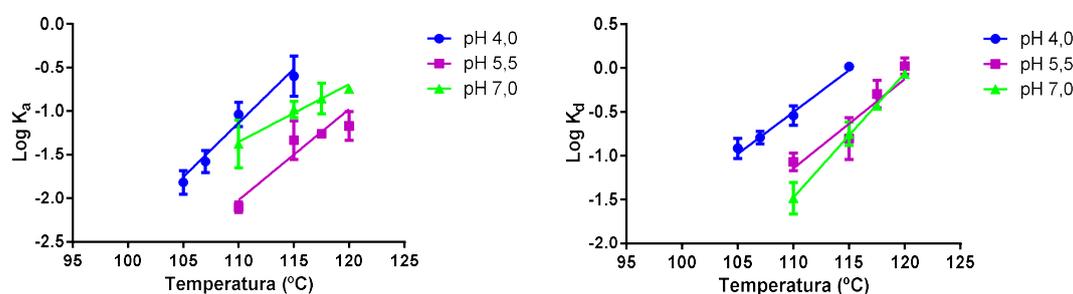


Figura 4.3.9. Relación de las constantes de activación (K_a) e inactivación (K_d) con la temperatura de tratamiento para cada pH: pH 7,0 (verde), pH 5,5 (morado) y pH 4,0 (azul).

Como se puede observar en las gráficas, la velocidad de activación e inactivación fueron muy dependientes de la temperatura a los tres pHs. Dentro de un mismo pH, la velocidad tanto de activación como de inactivación fue mayor a mayor temperatura, de manera que las dos constantes aumentaron exponencialmente con la temperatura. Cabe destacar que los valores de longitud del hombro (SI) también mostraron, en general, una

relación exponencial con la temperatura, pero en este capítulo nos centramos principalmente en la activación, por lo que no se profundizará en este fenómeno.

Se puede calcular el valor z a partir de las pendientes de las gráficas (Figura 4.3.9.) tanto de las constantes de activación (K_a) como las de inactivación (K_d). Como cabía esperar, el valor z de inactivación se modificó con el pH de tratamiento, siendo superior a pH ácido (10,5, 9,8 y 7,1 °C a pHs 4,0, 5,5 y 7,0), mostrando un R^2 de 0,92, 0,78 y 0,94, respectivamente. Por otro lado, los valores z de activación siguieron la tendencia contraria y fueron más pequeños para los pHs más ácidos 8,1, 9,6 y 15,1 °C a los pHs 4,0, 5,5 y 7,0, siendo el R^2 de 0,87, 0,80 y 0,67, respectivamente. El análisis estadístico mostró diferencias significativas tanto en los valores z de inactivación como de activación para los distintos pHs, así como, dentro de un mismo pH, entre los valores z para las constantes de activación e inactivación a los pHs 4,0 y 7,0 ($p < 0,05$), mientras que no había diferencias entre los datos de pH 5,5 ($p > 0,05$).

De los resultados obtenidos puede deducirse que la termodependencia, tanto de la activación como de la inactivación, fue dependiente del pH del medio de tratamiento, ya que para pH 7,0 la inactivación fue el proceso más dependiente de la temperatura, mientras que a pH 4,0 lo fue la activación.

Con objeto de poder estudiar el efecto del pH de tratamiento en las constantes de activación e inactivación, se empleó el parámetro K_d/K_a (Tabla 4.3.3.) y se realizó una regresión múltiple empleando el complemento de Excel Essential Regression. A partir de la ecuación obtenida se representó la Figura 4.3.10, donde se puede observar que la relación K_d/K_a se modificó tanto con el pH como con la temperatura de tratamiento. Esta relación fue mayor para los pHs ligeramente ácidos (alrededor de 5,3), y tendió a disminuir a las temperaturas intermedias del rango utilizado.

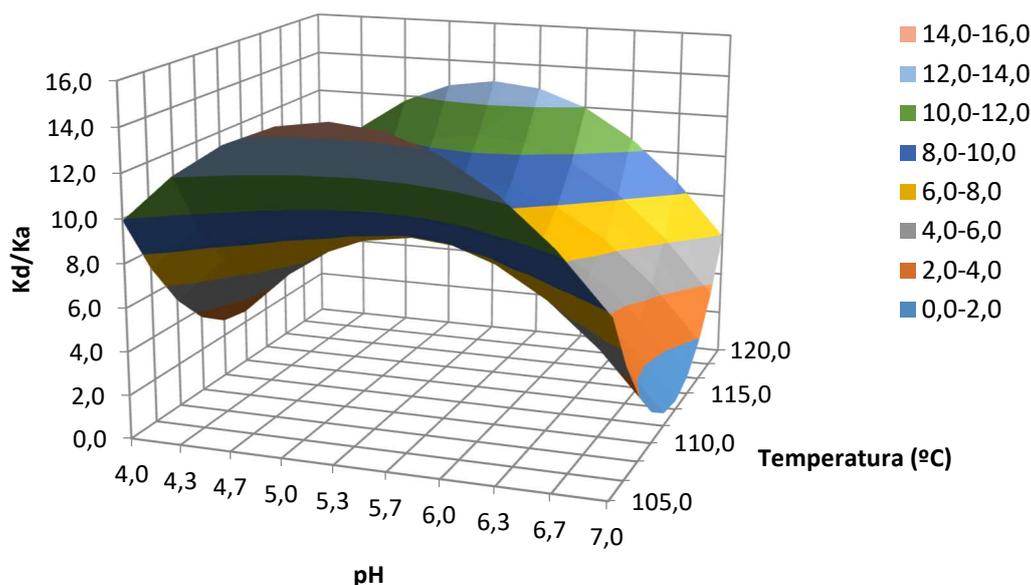


Figura 4.3.10. Relación entre la temperatura y el pH de tratamiento con el parámetro K_d/K_a .

En general, el modelo desarrollado describió con más precisión la activación e inactivación cuando el medio de tratamiento era de pH 4,0 y de pH 7,0. De hecho, en las gráficas obtenidas a pH 5,5, sobre todo a las temperaturas más bajas utilizadas, el fenómeno de activación parecía producirse muy lentamente, lo cual conducía a la obtención de una constante de activación con menor fiabilidad (Tabla 4.3.3).

Para intentar ahondar con mayor profundidad en este aspecto, y obtener una visión más robusta del efecto del pH en ambos fenómenos, se decidió hacer un estudio más amplio en el que se emplearon nueve pHs.

4.3.1.2. Efecto del pH en la activación e inactivación térmica de *G. stearothermophilus*

Pese a que el efecto del pH en la termorresistencia microbiana ha sido ampliamente estudiado, el efecto que desempeña en la activación no es tan conocido.

Por lo general se acepta que la termorresistencia máxima se presenta a pH neutro y se reduce al alejarse de la neutralidad (Jay, 1992). La magnitud del efecto del pH varía mucho, incluso entre cepas, y puede estar influido por otros factores como la temperatura o el medio de esporulación. Además del pH, el tipo de acidificante parece tener importancia en el descenso de la resistencia al calor (Leguérinel y Mafart, 2001). Sin

embargo, dado que no se conocen con precisión los mecanismos de termorresistencia de los esporos, no es sorprendente que tampoco lo sean los mecanismos de sensibilización al pH. Cabe destacar que apenas existen datos en la bibliografía sobre el efecto del pH en la activación de los esporos superlatentes. Pese a que en el apartado anterior se estudiaron los fenómenos de activación e inactivación a tres pHs, se decidió aumentar el estudio y emplear 9 pHs diferentes.

La Figura 4.3.11 muestra las gráficas obtenidas a 110°C en tampones de 9 valores de pHs comprendidos entre 8,0 y 4,0. La Figura 4.3.12 incluye la totalidad de las gráficas de supervivencia obtenidas, a efectos comparativos. En estas gráficas se puede observar que en todos los casos se encontraron hombros de activación. El tiempo al que se obtuvo el recuento máximo, así como el recuento máximo alcanzado, varió en función del pH. Los datos obtenidos experimentalmente fueron ajustados con el modelo desarrollado en este trabajo. Los parámetros del modelo se muestran en la Tabla 4.3.4.

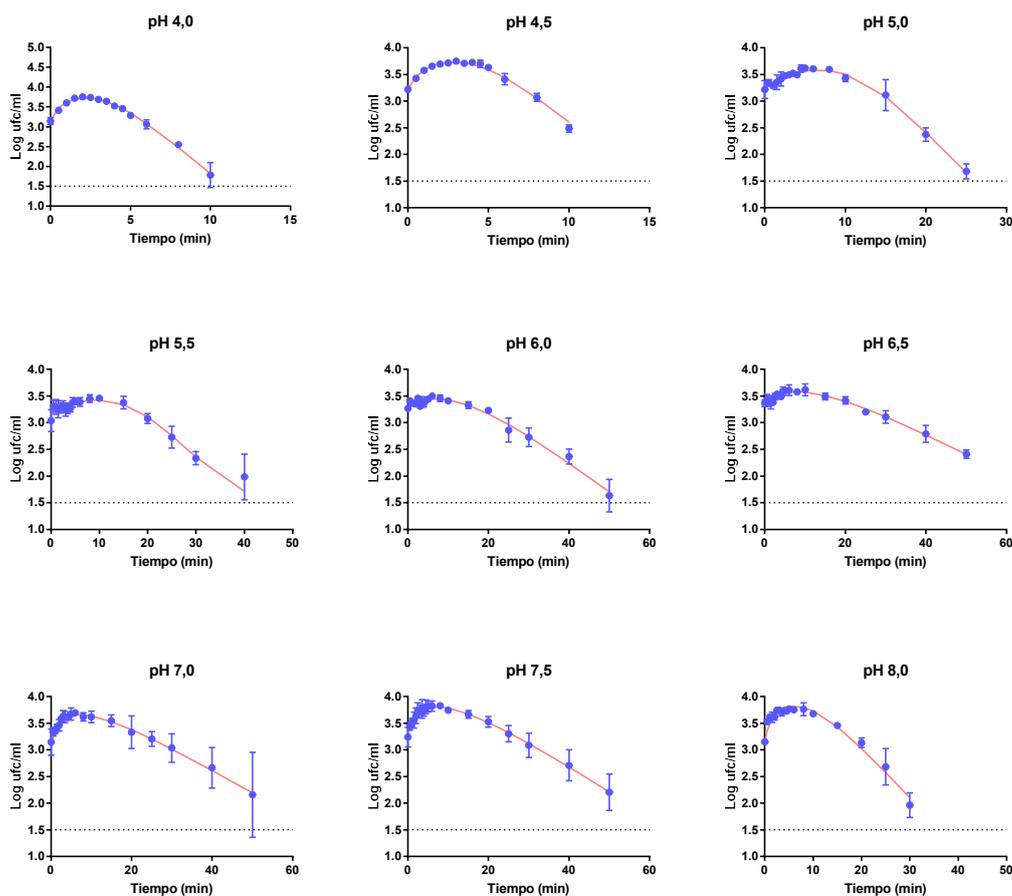


Figura 4.3.11. Gráficas de supervivencia de *G. stearothermophilus* a 110 °C en tampón McIlvaine a varios pHs. Las líneas muestran la modelización.

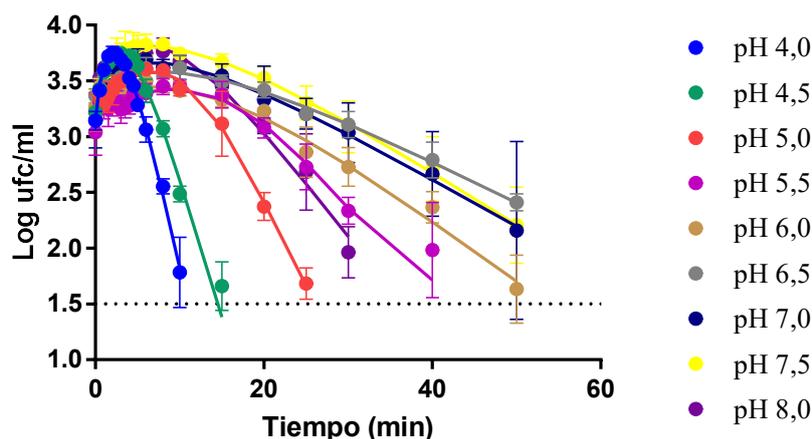


Figura 4.3.12. Gráficas de supervivencia de *G. stearothermophilus* frente al calor a 110 °C en tampón McIlvaine a varios pHs. La línea discontinua muestra el límite de detección.

En su conjunto, la supervivencia de *G. stearothermophilus* al tratamiento térmico a 110 °C fue superior a pH entre 7,5 y 6,5. Los pHs más ácidos o más alcalinos reducían la termorresistencia.

Tabla 4.3.4. Parámetros del modelo y bondad de los ajustes de *G. stearothermophilus* tratado a 110 °C a varios pHs, donde K_a es la constante de activación y K_d la constante de inactivación. Los datos de la tabla corresponden a la media y desviación estándar de tres determinaciones experimentales individuales. Para ilustrar la bondad del ajuste se han incluido los valores mínimos obtenidos para el coeficiente de determinación (R^2) y máximos para el error cuadrático medio (RMSE).

<i>pH</i>	K_a	K_d	<i>SI</i>	<i>2D</i>	R^2 mínimo	<i>RMSE</i> máximo
4,0	0,115±0,035	0,340±0,048	3,108±0,426	12,139±0,982	0,983	0,075
4,5	0,071±0,008	0,256±0,021	3,882±0,753	15,683±0,351	0,980	0,073
5,0	0,018±0,012	0,161±0,019	10,174±2,719	27,988±1,893	0,969	0,080
5,5	0,008±0,001	0,095±0,028	13,730±3,344	44,058±4,466	0,924	0,118
6,0	0,010±0,006	0,058±0,009	8,611±6,256	58,698±7,295	0,964	0,108
6,5	0,010±0,004	0,042±0,003	6,993±2,018	76,559±4,319	0,947	0,073
7,0	0,051±0,034	0,043±0,013	4,866±5,691	80,230±23,066	0,897	0,120
7,5	0,032±0,013	0,048±0,006	4,828±2,566	69,149±9,850	0,961	0,070
8,0	0,060±0,015	0,097±0,011	8,653±0,465	40,199±3,849	0,926	0,108

Para poder interpretar mejor los datos, la Figura 4.3.12 muestra los valores de K_a y K_d que incluye la Tabla 4.3.3. Como se puede observar, existió más variabilidad entre las réplicas en los valores de activación que de inactivación –la desviación estándar a pH 7,0 de K_a fue 0,37, mientras que de K_d fue 0,14. Ello podría ser debido a que la activación es un proceso complejo en el que influyen multitud de factores. Además, la activación se producía en un periodo de tiempo menor, y con diferencias en el recuento más reducidas que la inactivación, lo cual determina que lógicamente, la precisión en la determinación de K_d sea superior a la de K_a .

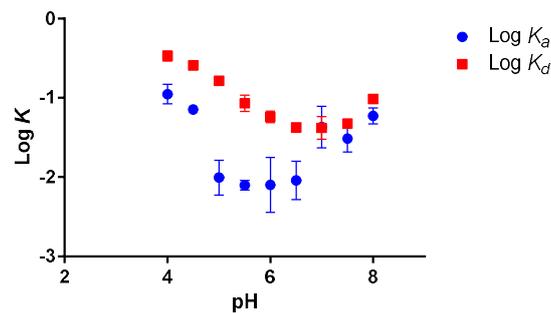


Figura 4.3.13. Relación entre los logaritmos de las constantes de activación (K_a) e inactivación (K_d) y el pH a una temperatura de tratamiento de 110 °C.

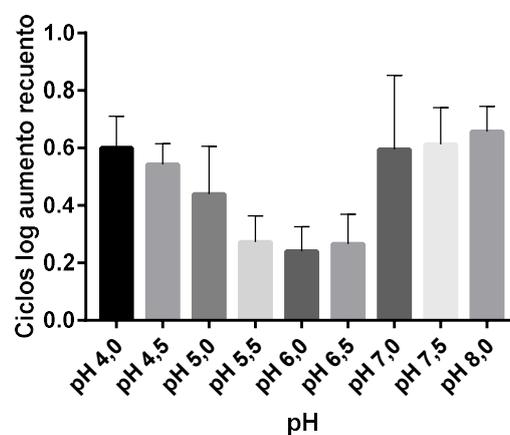


Figura 4.3.14. Representación del número de ciclos log máximos que aumenta el recuento a cada pH.

Como se puede apreciar en las Figuras, la constante de inactivación fue mínima a pH 6,5-7,0 y máxima a pH 4,0, dentro del rango de pH utilizado. La constante de

inactivación también disminuyó cuando el pH se encontraba por encima de los valores neutros.

Por otro lado, y tal como se ha mostrado en la sección anterior, la activación mostró un comportamiento diferente, su constante fue mínima a pH entre 5,0 y 6,5 y aumentó a pHs mayores y menores, alcanzando su máximo valor a pH 4,0, dentro del rango investigado. Es decir, a estos pHs de alrededor de 5,5-6,5 se observaba menor grado de activación que a otros pHs. El fenómeno observado no se ha descrito hasta la fecha, y aunque no se conoce el motivo por el que ocurre, estaría relacionado con la activación de los esporos superlatentes presentes y no con el comportamiento de los esporos latentes.

La activación de los esporos superlatentes fue más rápida a pH 4,0, como también lo fue la inactivación de la población total. Este hecho podría indicar que ambos fenómenos, activación e inactivación, podrían estar relacionados entre sí, o depender de la misma estructura celular. No obstante, la velocidad mínima de activación, entre pH 5,5 y 6,5, tuvo lugar a pH ligeramente más ácido que la velocidad mínima de inactivación, que se verificó a pH 6,5-7,5. La relación entre los parámetros K_d y K_a dependió del pH del tratamiento y fue superior a los pHs centrales dentro del rango estudiado (5,0 – 6,5) tal y como habíamos observado previamente (Figura 4.3.10).

Por lo que respecta a la magnitud del fenómeno de activación observado en las gráficas, la Figura 4.3.14 muestra que varió entre 0,30 y 0,65 ciclos Log, siendo mínima a pH entre 5,5 y 6,5 y aumentando tanto hacia los pHs más ácidos como hacia los más alcalinos.

4.3.2. Activación con Ca-DPA

El dipicolinato cálcico, como se comentó en la introducción, es un compuesto exclusivo del protoplasto de los esporos bacterianos. Una de las funciones de este compuesto es la de activar los enzimas líticos del córtex durante la germinación, normalmente el Ca-DPA sale del protoplasto y activa el enzima CwlJ (Ragkousi y col., 2003). Sin embargo, se ha observado que también la adición de dipicolinato cálcico exógeno estimula la germinación de los esporos (Riemann y Ordal, 1961), previsiblemente iniciando la ruptura del córtex, de igual modo que actúa el Ca-DPA endógeno.

En primer lugar, en este estudio se planteó la duda de si para que los esporos se activaran era necesario el dipicolinato cálcico o tan solo DPA. Para ello se realizó una exploración que se muestra en la Figura 4.3.15.

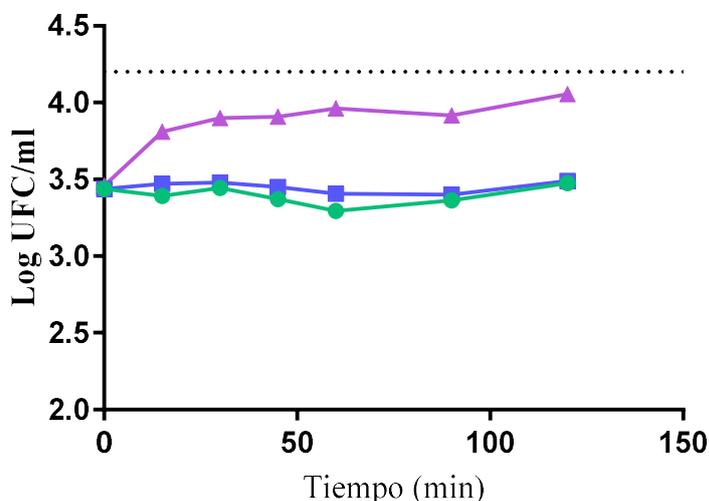


Figura 4.3.15. Efecto de la adición de CaCl₂ (60 mM) (●), DPA (60 mM) (■) y Ca-DPA (60 mM) (▲) en el recuento en placa de *G. stearothermophilus*. La línea discontinua marca el recuento máximo esperable, estimado mediante recuento microscópico total de esporos.

Tal y como se puede observar en la Figura 4.3.15, para que tuviera lugar la activación era necesaria la adición de Ca-DPA y no exclusivamente de DPA, tal y como otros autores habían descrito (Riemann y Ordal, 1961). Tras comprobar este aspecto, se procedió a estudiar la cinética de activación/germinación con este compuesto.

Uno de los aspectos fundamentales del estudio de cualquier agente en la inactivación microbiana es conocer su cinética de inactivación y el efecto que diferentes parámetros, como la temperatura, ejercen en ella. Por este motivo, dado que en la bibliografía no se encontraron datos de cinética de activación de esporos con Ca-DPA, en esta tesis se decidió estudiar el efecto de la concentración de dipicolinato cálcico exógeno, así como de la temperatura y el tiempo en la activación de esporos de *G. stearothermophilus*, atendiendo al aumento del recuento en placa.

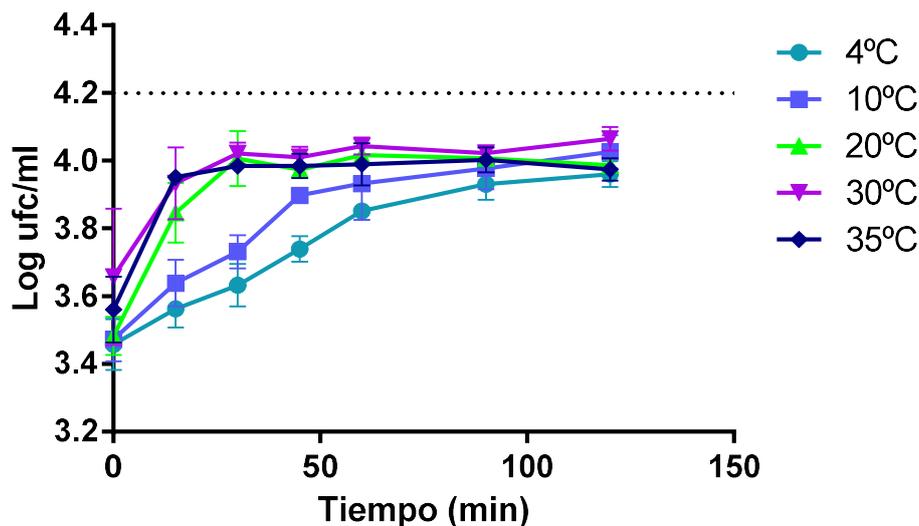


Figura 4.3.16. Efecto de la temperatura de tratamiento en la activación de *G. stearothermophilus* con 60 mM de Ca-DPA. La línea discontinua marca el recuento máximo esperable.

Como se puede apreciar en la Figura 4.3.16, la temperatura de tratamiento, como era previsible, influyó en la activación de este microorganismo con dipicolinato cálcico, siendo más rápida a mayor temperatura. Sin embargo, a todas las temperaturas empleadas se alcanzó el mismo valor máximo de recuento, pero tras diferentes tiempos. A temperaturas de 20, 30 y 35°C no se observaron diferencias a partir de 15 minutos de exposición. El aumento del recuento observado fue de 0,5 ciclos Log, indicando la presencia de un 72% de esporos superlatentes, aproximadamente.

En estos experimentos preliminares se empleó una concentración de Ca-DPA de 60 mM, puesto que es la concentración más frecuentemente empleada en la bibliografía (Paidhungat y col., 2001; Ragkousi y col., 2003), sin embargo, en el presente estudio se decidió estudiar también el efecto de la concentración en la activación de este microorganismo.

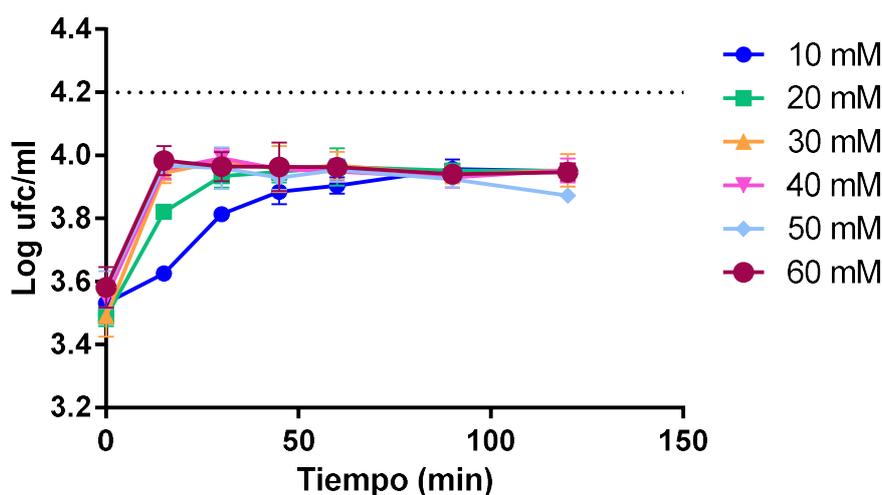


Figura 4.3.17. Activación de esporos de *G. stearothermophilus* tratados con varias concentraciones de Ca-DPA a temperatura ambiente. La línea discontinua marca el recuento máximo esperable.

La Figura 4.3.17 representa el efecto de la concentración de dipicolinato cálcico en la activación de los esporos de *G. stearothermophilus*, atendiendo al aumento de recuento en placa. Como se puede apreciar, en todos los casos el recuento aumentó con respecto al tiempo cero de tratamiento. También se observó que a mayor concentración, más rápida fue la activación, llegando en todos los casos a un mismo recuento máximo. El recuento máximo observado en todos los casos supuso un incremento de 0,5 ciclos log. aproximadamente. De la Figura 4.3.17 también se desprende que concentraciones superiores a 30 mM no supondrían mayores recuentos ni mayor rapidez de activación. Esto sugiere que, a concentraciones superiores, el Ca-DPA se encontraría en exceso, sin que esto suponga ninguna mejora, al menos en las concentraciones celulares empleadas en este estudio, lo que contrasta con la bibliografía en la que de forma habitual se emplea una concentración de 60 mM (Paidhungat y col., 2001; Ragkousi y col., 2003).

Por otro lado, el hecho de que no todos los esporos superlatentes respondan a este tratamiento sugiere que, o bien hay una fracción de esporos superlatentes frente a Ca-DPA, o se debe a que durante el tratamiento suceden simultáneamente varios fenómenos: la activación, la germinación de algunos esporos y la inactivación de otros. Para estudiar estas posibilidades se realizaron varias exploraciones que se exponen a continuación.

En primer lugar, se estudió qué ocurría cuando, tras el tratamiento con Ca-DPA, se aplicaba una pasterización. Es decir, si todos los esporos se activaban y germinaban como resultado de la adición de Ca-DPA, deberían inactivarse durante la pasterización (75°C/30min) (Figura 4.3.20).

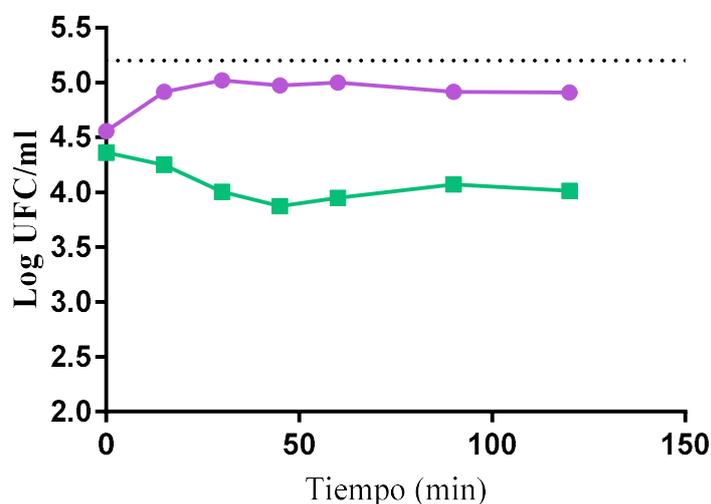


Figura 4.3.18. Efecto de la activación/germinación de esporos de *G. stearothermophilus* expuestos a Ca-DPA (20 mm) sin (●) y con (■) un tratamiento de pasterización posterior (75 °C/30 min). La línea discontinua marca el recuento máximo esperable.

Analizando los datos de la Figura 4.3.18 se puede observar que, tal y como se había observado previamente, al aplicar un tratamiento con Ca-DPA, el recuento microbiano en placa aumentaba alrededor de medio ciclo log. Si de forma posterior al tratamiento con Ca-DPA se aplicaba una pasterización, el recuento descendía un ciclo Log con respecto al máximo obtenido con Ca-DPA. Esto implicaba que el Ca-DPA tan solo producía la sensibilización frente al calor (germinación) de una fracción de esporos, que parecía incluir mayoritariamente, pero no podemos asegurar que exclusivamente, la fracción de superlatentes. Por otro lado, si tras la pasterización se aplicaba un segundo tratamiento con Ca-DPA, el recuento no volvía a aumentar (Figura 4.3.19), por lo que la reducción del recuento no se debería a un proceso de reversión de la activación, sino de inactivación. Es decir, en el primer tratamiento con Ca-DPA se activarían y germinarían los esporos superlatentes (al menos la mayor parte de ellos) y parte de los esporos latentes, que posteriormente se inactivaban con el tratamiento térmico. Por tanto, quedaría una fracción de esporos latentes sin responder al tratamiento de CaDPA.

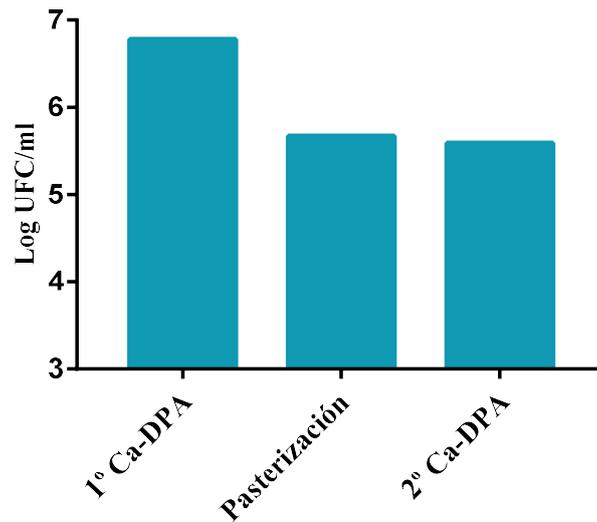


Figura 4.3.19. Efecto de un primer tratamiento con Ca-DPA (60 mM/2 horas), una posterior pasterización (75 °C/30 min) y un segundo tratamiento con Ca-DPA (60 mM/2 horas) en esporos de *G. stearothermophilus*.

Por otro lado, se decidió explorar también el ritmo de germinación de los esporos con Ca-DPA a 75 °C, en este caso observando la inactivación térmica de manera simultánea (Figura 4.3.20). Es decir, a medida que los esporos fueran activándose y/o germinando como resultado del tratamiento con Ca-DPA, irían inactivándose por la acción de la temperatura.

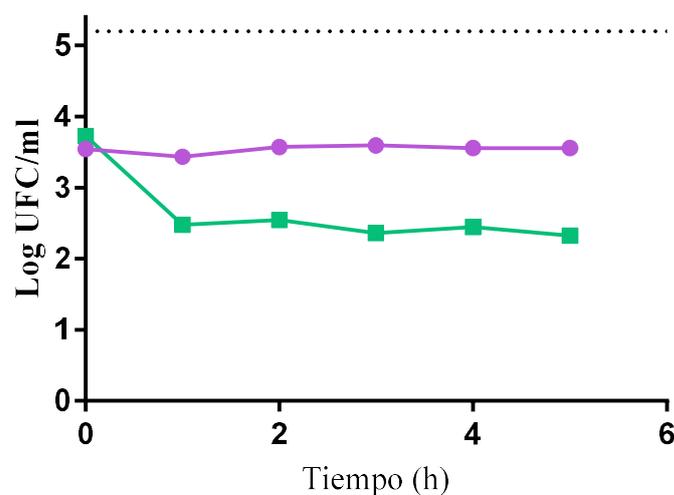


Figura 4.3.20. Tratamiento de esporos de *G. stearothermophilus* con Ca-DPA a 75°C (cuadrados) y en agua destilada estéril a 75°C como control (círculos).

Como se aprecia en la Figura 4.3.20, de nuevo se observó que los esporos que presuntamente se activaban y germinaban en presencia de Ca-DPA, se inactivaban totalmente como resultado de la acción de la temperatura. Además, todo ello sucedía durante la primera hora de exposición al CaDPA, ya que, a partir de ahí, el recuento se mantenía estable. Por tanto, confirma que en la suspensión se encuentra una fracción de esporos que son incapaces de responder al Ca-DPA, y/o poseen otro mecanismo de germinación independiente al inducido por el Ca-DPA. A efectos prácticos, resulta imposible distinguir entre un espora inactivado y un espora que no responde al estímulo de germinación.

4.3.3. Activación con HCl

La activación de esporos con tratamientos ácidos ha sido descrita por diferentes investigadores. Lewis y col. (1965) demostraron que *G. stearothermophilus* se activaba parcialmente con tratamientos a pH 1,5 durante 80 minutos a 25 °C y que, con un tratamiento con Ca^{++} posterior, se restablecía la latencia. Brown y col. (1968) también observaron activación en *G. stearothermophilus* con un tratamiento de 0,5 M HCl a 25 °C y una inactivación posterior a partir de los 30 minutos de tratamiento. Además, Brown y col. (1968) observaron también que el tratamiento producía la liberación de DPA.

Sin embargo, se conoce poco acerca de la activación/germinación con tratamientos ácidos, por lo que decidimos estudiarlo.

En primer lugar, se estudió el efecto de la concentración de HCl (Figura 4.3.21). Las concentraciones de HCl seleccionadas fueron establecidas de acuerdo a los datos obtenidos de la bibliografía. Se empleó como concentración más elevada 0,3 N, que fue la concentración más baja empleada por Setlow y col. (2002) en los estudios de inactivación de *B. subtilis*. Teniendo en cuenta que en este estudio se pretendía estudiar la activación, se seleccionaron concentraciones menores de HCl.

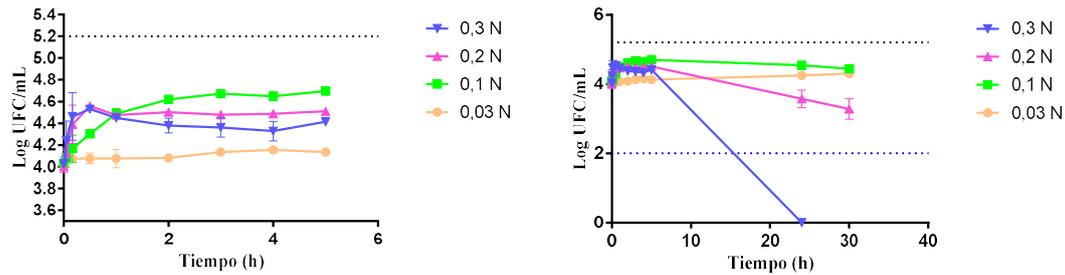


Figura 4.3.21. Activación de esporos de *G. stearothermophilus* con varias concentraciones de HCl a temperatura ambiente. Ambas figuras representan los mismos datos experimentales. La línea discontinua negra marca el recuento máximo esperable y la línea discontinua azul el límite de detección.

Como se aprecia en la Figura, a mayor concentración de HCl, se observó mayor velocidad de activación. Sin embargo, a las concentraciones más elevadas, 0,2 y 0,3 N, el recuento no llegó a aumentar tanto como en caso de 0,1 N. Esto podría deberse a que además de activación, también en esos casos está teniendo lugar, de forma simultánea, la inactivación de parte de los esporos. En las gráficas se puede apreciar claramente que, si se alargaba el tiempo lo suficiente, tras la activación, los esporos se inactivaban como resultado de la exposición al HCl.

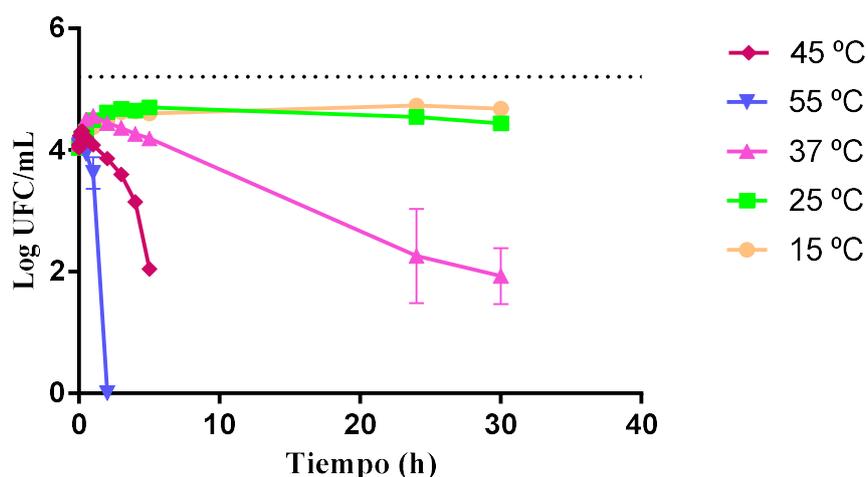


Figura 4.3.22. Activación de esporos de *G. stearothermophilus* con HCl 0,1 N a varias temperaturas. La línea discontinua negra marca el recuento máximo esperable.

Por otro lado, se estudió el efecto de la temperatura de tratamiento en la activación de los esporos con HCl 0,1 N. En este caso se observó que a mayor temperatura, mayor velocidad de activación, pero también de inactivación. Además, al igual que en el caso anterior, al aumentar la velocidad, los recuentos no llegaban a los valores observados cuando la velocidad era menor, es decir, a temperaturas más bajas. La razón de este comportamiento sería que, en estos casos, la inactivación sería simultánea a la activación, y se producía un efecto sinérgico entre la acidez y el calor, a efectos de la inactivación. A 25°C se observó una activación correspondiente a 0,5 ciclos Log, es decir, el 75% de la población, aproximadamente. No existen hipótesis intentando explicar el efecto activador de la acidez, sin embargo, sí respecto a la pérdida de termorresistencia. Se ha sugerido que en medios ácidos podría producirse, como hemos mencionado en otros apartados de esta memoria, la protonización del córtex, su colapso y la entrada de agua en el protoplasto, que a efectos prácticos es el evento más importante de la germinación.

Dado que se comprobó que el tratamiento con HCl era capaz de activar los esporos superlatentes de *G. stearothermophilus* y, que el dipicolinato cálcico también, se decidió estudiar el efecto de este compuesto en su forma ácida, sin neutralizar. Es decir, se estudió el efecto del ácido dipicolínico.

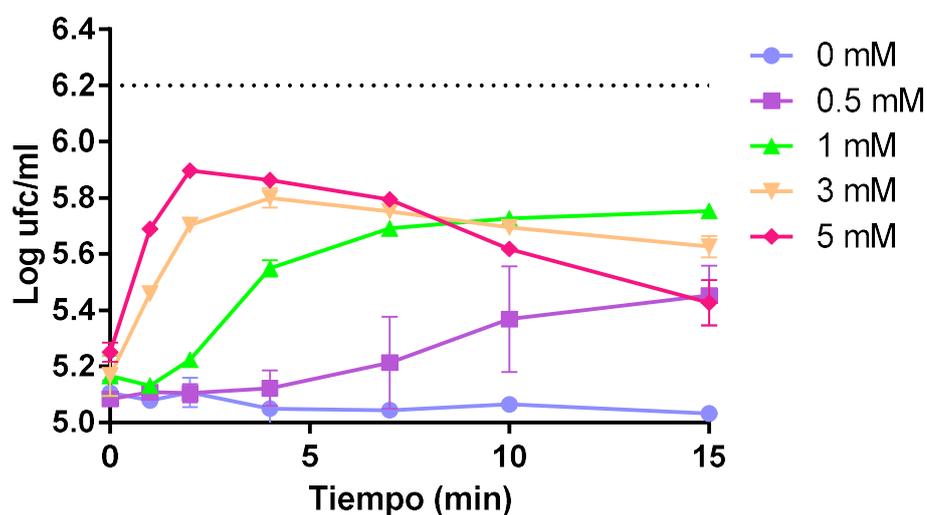


Figura 4.3.23. Efecto del ácido dipicolínico en la activación de esporos de *G. stearothermophilus* a varias concentraciones y a temperatura ambiente. La línea discontinua negra marca el recuento máximo esperable.

Como se puede apreciar en la Figura 4.3.23, este compuesto en su forma ácida produjo mayor activación que el dipicolinato cálcico, un aumento del recuento de aproximadamente 0,7 ciclos log, que en ocasiones alcanzaba hasta 1 ciclo Log. Probablemente este mayor efecto se debe a la combinación del DPA con la acidez. Es importante tener en cuenta que además de alcanzarse un mayor grado de activación de esporos, se necesitaban concentraciones de DPA muy inferiores, prácticamente 10 veces menores. También en este caso se producía la inactivación de parte de la población de manera simultánea a la activación de los superlatentes.

4.3.4. Exploración de la activación con nuevas tecnologías: HHP, PEAV y radiación UV

En esta tesis se decidió estudiar también el efecto de varias tecnologías emergentes en la activación de esporos bacterianos dado el interés que han suscitado estos métodos de conservación en los últimos años. El principal problema que poseen dichas tecnologías es, precisamente, su incapacidad de inactivar esporos. Sin embargo, no se ha estudiado en profundidad el efecto que tienen en la activación y/o germinación.

- Altas presiones hidrostáticas (HHP)

Las altas presiones hidrostáticas es la tecnología emergente más empleada en la actualidad a nivel industrial en la pasteurización de alimentos (Sarker y col., 2015). El mecanismo de acción de esta tecnología en células vegetativas sería un proceso “multi target”, siendo el daño de la membrana citoplasmática un aspecto clave en la inactivación (Mañas y Pagán, 2005).

En el caso de los esporos, la presurización actuaría en dos niveles, primero desencadenando la germinación y, posteriormente, inactivándolos. Además, se ha observado que el mecanismo por el que se desencadenaría la germinación dependería de la presión empleada. A bajas presiones (entre 100 y 300 MPa) se induciría a través de los receptores de la germinación (Black y col., 2005), es decir, por la misma vía que los nutrientes, mientras que presiones elevadas (500-600 MPa) podrían inducir la germinación abriendo de alguna manera los canales de salida del DPA (Vepachedu y col., 2007). No obstante, pese a que la germinación de esporos latentes sí que ha sido descrita,

no hay datos en la bibliografía sobre el efecto de esta tecnología en los esporos superlatentes. Para estudiar este aspecto en esta tesis se empleó *G. stearothermophilus* dada su elevada proporción de esporos superlatentes. Las condiciones empleadas fueron 200, 300 y 400 MPa y varios pHs (Figura 4.3.24). El equipo del que disponíamos no permitía aplicar tratamientos más intensos.

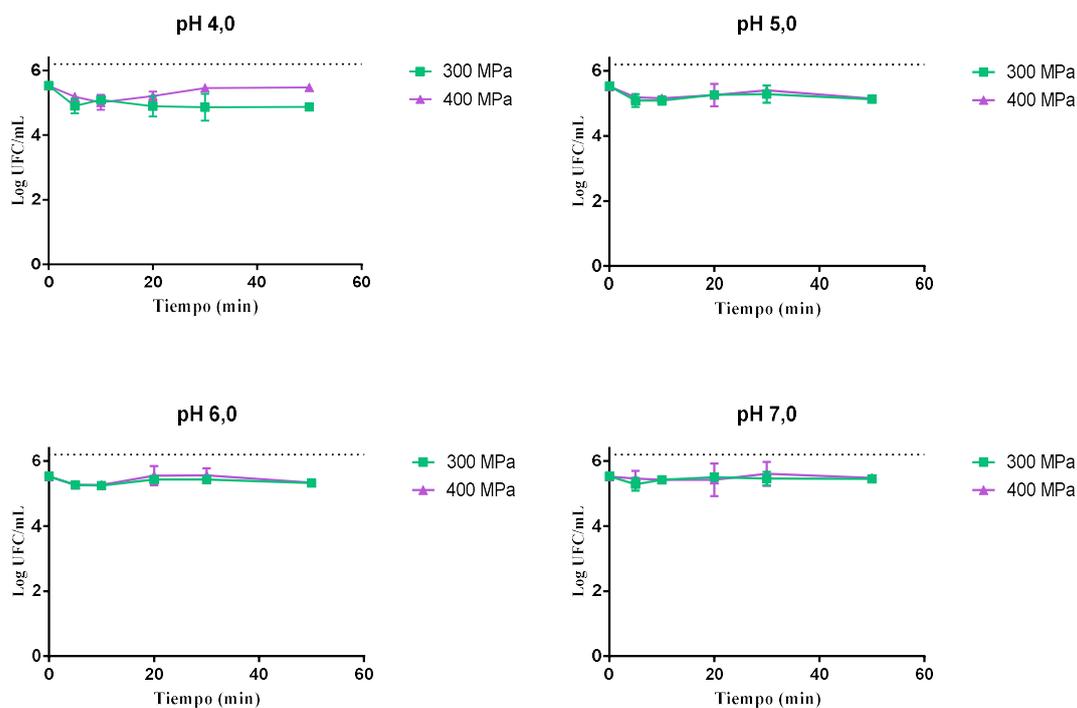


Figura 4.3.24. Efecto de las altas presiones hidrostáticas en la activación de esporos de *G. stearothermophilus* a varias presiones y pHs. La línea discontinua negra marca el recuento máximo esperable.

En la Figura 4.3.24 se puede observar que estos tratamientos apenas produjeron cambios en los recuentos microbianos de esta especie. Aunque de pequeña magnitud, sí se apreciaba un ligero descenso en el recuento en los tiempos iniciales de tratamiento y un ligero aumento posterior. Además, este fenómeno era más acusado a los pHs más ácidos. Este comportamiento podría deberse a una inactivación inicial de una parte de los esporos latentes, seguida de la activación de una pequeña parte de los esporos superlatentes. En cualquier caso, las altas presiones, en nuestras condiciones de tratamiento, no desencadenaron la activación de una elevada fracción de esporos superlatentes.

- Pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV)

Se decidió también estudiar el efecto de los pulsos eléctricos de alto voltaje en la activación de esporos. Esta tecnología consiste en la aplicación intermitente de campos eléctricos de alta intensidad y corta duración (microsegundos o milisegundos) a un material colocado entre dos electrodos. El mecanismo de acción es la permeabilización de las envolturas celulares, por lo que resulta muy útil para extraer compuestos del interior celular, así como en la inactivación de microorganismos. Sin embargo, no está claro su posible efecto sobre la activación/germinación de esporos bacterianos.

En este estudio realizamos una exploración sobre el efecto de esta tecnología en la activación de esporos de *G. stearothermophilus* (Figura 4.3.25).

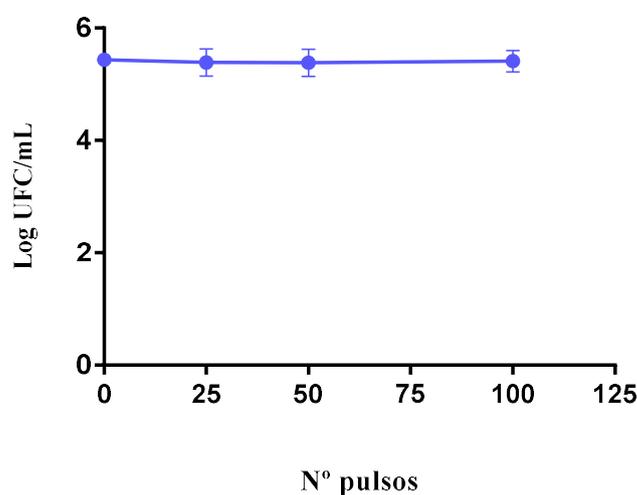


Figura 4.3.25. Efecto de los pulsos eléctricos de alto voltaje (25 kV/cm a pH 7,0) en la activación de esporos de *G. stearothermophilus*.

Como se puede apreciar en la Figura 4.3.25, el recuento se mantuvo constante a lo largo del tratamiento, por lo que esta tecnología, en las condiciones estudiadas, no consiguió activar los esporos de *G. stearothermophilus*.

Por otro lado, se decidió explorar también el efecto de la acidez (pH 4,0) en combinación con esta tecnología, ya que se ha descrito que la acidez en los tratamientos de PEAV afecta a la resistencia de las células vegetativas. En Gram positivas parece reducir su resistencia mientras que en Gram negativas la aumentaría (Lelieveld y col.,

2007). Los resultados obtenidos mostraron que tampoco se producía activación de superlatentes tras tratamientos de 25 kV/cm de 100 pulsos (datos no mostrados).

- Radiaciones ultravioleta (UV)

Por último, se estudió también el efecto de las radiaciones UV en la activación de *G. stearothermophilus*. Al contrario de lo que ocurre en el caso de los PEAV, esta tecnología si es capaz de inactivar esporos, aunque su resistencia es muy superior a la resistencia de las células vegetativas (Nicholson y col., 2000; Soni y col., 2016). El mecanismo de acción de las radiaciones UV es, tanto en esporos como en células vegetativas, el daño en el material genético. Sin embargo, la mayor resistencia de los esporos se ha relacionado principalmente con las proteínas SASPs, que modifican las propiedades fotoquímicas del DNA, favoreciendo la formación de compuestos menos tóxicos que los que se producen en las células vegetativas (Nicholson y col., 2000). En cualquier caso, dada la naturaleza del mecanismo de acción, era previsible que no ejerciera ningún efecto en la activación. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 4.3.26.

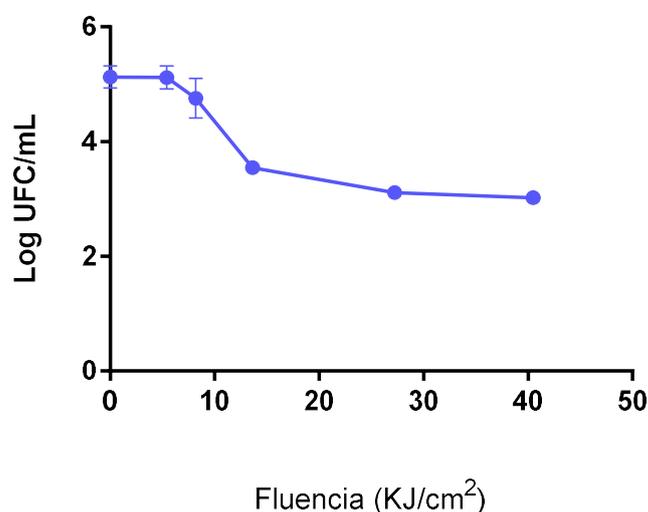


Figura 4.3.26. Efecto de la radiación UV, a distintas fluencias y pH 7, en la activación de esporos de *G. stearothermophilus*.

Como se aprecia en la Figura 4.3.26, esta tecnología tampoco indujo la activación de los esporos. Por otro lado, sí que consiguió inactivar parte de la población. Cabe

destacar que la instalación disponible no permitía aplicar tratamientos de menor intensidad, con fiabilidad suficiente.

4.3.5. Discusión

En este capítulo se ha estudiado el efecto de varios agentes en la activación de esporos de *G. stearothermophilus*. Los tratamientos que consiguieron activar esporos superlatentes, a juzgar por el aumento del recuento al inicio del tratamiento, fueron los tratamientos térmicos, con Ca-DPA y HCl, mientras que con ninguna de las tres nuevas tecnologías empleadas (HHP, PEAV y UV) se observó este efecto, o fue de muy pequeña magnitud.

Cabe destacar la enorme dificultad que entraña la interpretación de estos estudios debido a la presencia de dos poblaciones de esporos: latentes y superlatentes. Por tanto, en algunos casos el recuento obtenido podría ser el resultado de dos sucesos: la activación de los esporos superlatentes y la inactivación de los esporos latentes. Además, no se conocen las diferencias que hay entre ambas poblaciones, lo que complica aún más la interpretación de los resultados. A este respecto, parece que la teoría más aceptada es la presencia de un número menor de receptores de la germinación en los esporos superlatentes, lo que les dificultaría la germinación inducida por nutrientes. Esto podría explicar el motivo por el que sí que son capaces de responder a otros tratamientos como Ca-DPA y HCl.

En el caso del calor, la mayoría de los trabajos científicos atribuyen el fenómeno de activación a cambios estructurales provocados por el calor en los receptores de nutrientes (Setlow, 2014; Zhang y col., 2009). Este cambio provocaría que un receptor previamente en estado inactivo, adquiriera funcionalidad permitiendo así la germinación. Dados los resultados obtenidos en este estudio, es evidente que dicho cambio dependería de la energía térmica recibida por el espora y estaría modulada por el pH ambiental. Tampoco se puede descartar que dicho cambio no tuviera relación con los receptores de nutrientes, sino que estuviera relacionado con otros aspectos de la fisiología del espora, como la permeabilidad de las estructuras celulares. En este sentido, algunos autores han descrito que a pHs de tratamiento térmico en torno a 5,0 se liberaría más DPA que a pHs neutros y ácidos (Bevilacqua y col., 2015; Reyes y col., 2019).

Dado el perfil observado del cambio de las constantes de activación y de inactivación en función del pH del medio, tampoco se puede descartar que la estabilidad de los receptores de nutrientes, o de las estructuras que determinan su funcionalidad esté determinada por los valores pKa de determinadas proteínas.

Al margen de las posibles hipótesis basadas en la presencia de esporos superlatentes (a los nutrientes) dentro de la población de *G. stearothermophilus*, es importante tener en cuenta que este tipo de perfil de gráficas de supervivencia pueden aparecer también en poblaciones de otras especies microbianas esporuladas que no presentan habitualmente fenómenos de superlatencia a los nutrientes. Por ejemplo, en el trabajo llevado a cabo por Marcén (2018) con esporos de *Bacillus subtilis*, se observaron curvas como las que se muestran en la Figura 4.3.27.

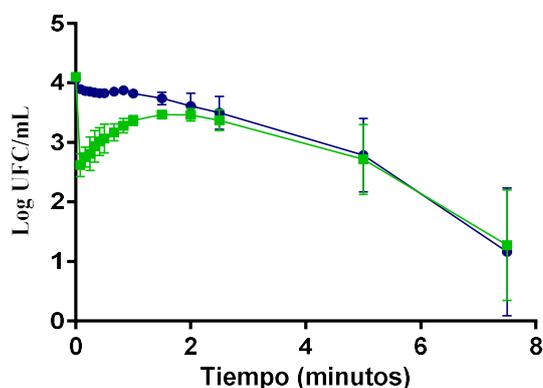


Figura 4.3.27. Gráficas de supervivencia de *B. subtilis* a 100 °C y pH 7,0, recuperando los supervivientes en agar nutritivo (●) y en medio mínimo (■). Extraído de Marcén (2018).

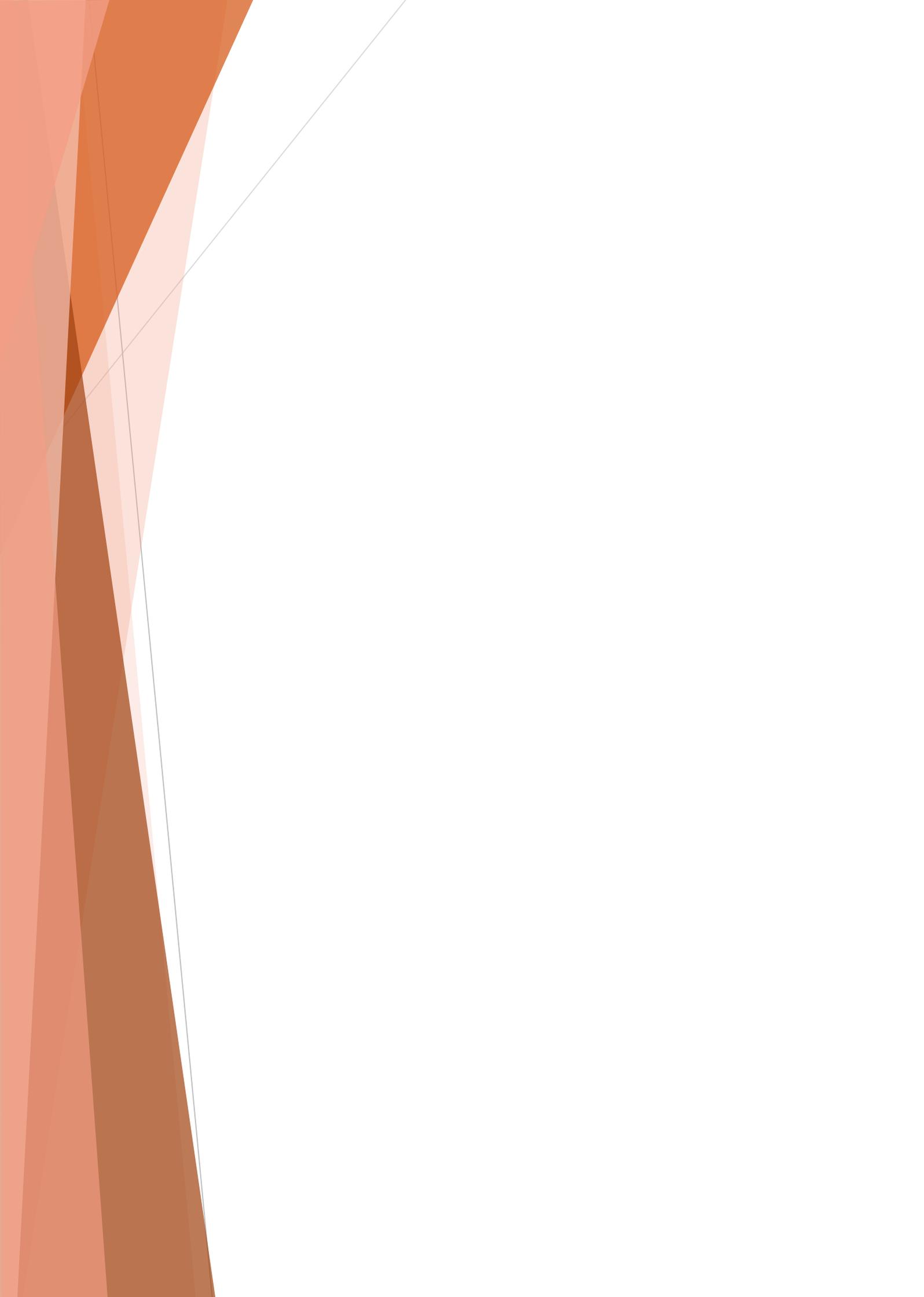
En este trabajo se demostró que los esporos de *B. subtilis* perdían la capacidad de germinar y desarrollarse en un medio mínimo de manera instantánea cuando eran sometidos a la acción del calor, y que esta capacidad se recuperaba de manera gradual al aumentar dicho tiempo de exposición al calor. Este efecto, sin embargo, no se evidenciaba si los esporos se recuperaban en un medio complejo, lo cual indicaba que los receptores de nutrientes permanecían funcionales tras la exposición a la energía térmica. Los perfiles de las curvas de supervivencia obtenidas en medio mínimo eran muy similares a los perfiles de las curvas descritas en el presente trabajo, pudiéndose determinar también unas constantes de activación y de inactivación, que también dependían del pH del medio de

calentamiento, y pudiéndose describir la inactivación a través de un modelo matemático muy similar al descrito en la presente tesis. *B. subtilis* no es considerada como una especie en la que se generen esporos superlatentes en cantidad relevante, y en este caso se dedujo que el fenómeno observado se podía atribuir a una pérdida de capacidad de germinación por vías alternativas a la iniciada por receptores de nutrientes, vías que se irían reactivando por la acción continuada del calor durante el propio tratamiento térmico (Marcén, 2018). Los mecanismos moleculares últimos que explicarían este comportamiento también son desconocidos.

Estos fenómenos ponen de manifiesto la necesidad de obtener mayor conocimiento científico profundo acerca de los mecanismos de activación y de germinación de las especies esporuladas. Comprender los mecanismos de activación y las limitaciones de las distintas vías de germinación resulta esencial para el desarrollo de procesos combinados que permitan conseguir la esterilidad comercial utilizando tratamientos térmicos de menor intensidad. En cualquier caso, el modelo desarrollado permitiría describir con precisión la cinética de activación e inactivación por calor de los esporos de *G. stearothermophilus*, contribuyendo así a un mejor conocimiento del fenómeno de activación y de los posibles mecanismos involucrados en su desarrollo.

Por otro lado, de los resultados expuestos en este capítulo se deduce que la magnitud del fenómeno de activación en *G. stearothermophilus* depende de las condiciones medioambientales aplicadas. En muchas de las condiciones utilizadas en este estudio no se logró alcanzar el recuento máximo esperable para este microorganismo, si bien se observó que la combinación de DPA con acidez incrementaba la recuperación de superlatentes, llegando incluso a 1 ciclo Log. No obstante, estos resultados ponen de manifiesto que la proporción estimada de superlatentes depende del tratamiento aplicado, como ya se ha descrito en la bibliografía, y que muy probablemente, esta proporción puede modificarse con las condiciones de almacenamiento y obtención de las suspensiones de esporos.

4.4. Estudio acerca de la germinación en *Bacillus subtilis*



Como es bien sabido, un aspecto fundamental de los esporos bacterianos es su capacidad para germinar, dado que para poder multiplicarse necesitan germinar primero. Además, los esporos una vez germinados, son mucho más sensibles a todos los tratamientos tanto físicos como químicos, por lo que una estrategia de inactivación de esporos propuesta es, o bien inhibir su germinación, o bien inducirla para poder aplicar un tratamiento posterior menos intenso. Es por ello que se considera fundamental estudiar y conocer todos los aspectos que conlleva.

Este capítulo se centró en estudiar los cambios que desencadena la germinación en los esporos de *B. subtilis*. Se decidió emplear este microorganismo por tratarse de una especie en la que apenas hay esporos superlatentes, lo que facilitaba la interpretación de los resultados. Además, *B. subtilis* es la bacteria esporulada tomada como referencia en muchos estudios de fisiología fundamental.

Como paso previo, se decidió optimizar las condiciones de germinación con los diferentes agentes, explorando varias condiciones de tiempo, concentración/intensidad de tratamiento y temperatura para después seleccionar las más adecuadas. Una vez seleccionadas las condiciones de germinación con cada agente, se comenzó con el estudio de distintos eventos que tienen lugar en distintas fases de la germinación. Por un lado, se estudiaron eventos que tienen lugar en la fase I de la germinación: salida de DPA del protoplasto y descenso de densidad óptica. Y, por otro lado, se estudió la permeabilidad del córtex a un colorante específico, el Syto 16, así como la pérdida de termorresistencia, eventos que caracterizan la fase II de la germinación. Además, se estudió también la permeabilidad de la membrana interna mediante tinción con IP, ya que se trata de la barrera de permeabilidad más importante que tienen los esporos, determinando por lo tanto la entrada y salida de sustancias, y el lugar donde se encuentran los receptores de nutrientes.

Como ya se comentó en la introducción, lo que previsiblemente desencadenaría la germinación en la naturaleza sería la presencia de nutrientes. Estos nutrientes, llamados germinantes nutritivos, son específicos de cada especie y cepa e incluyen algunos aminoácidos, azúcares y derivados de purina (Paidhungat y Setlow, 2002). La germinación con nutrientes comienza con la unión del nutriente con los receptores de la germinación, que es la señal que provoca la salida de iones y de DPA. Esto a su vez activa los enzimas líticos del córtex, que degradan el córtex y facilitan la hidratación del protoplasto. Una vez que el contenido en agua del protoplasto aumenta, el conjunto de

enzimas celulares empieza a funcionar y se inicia la actividad metabólica, para dar lugar a la nueva célula vegetativa.

Sin embargo, pese a que en la naturaleza predomine o sea exclusiva la germinación por nutrientes, se han descrito otros agentes capaces de inducirla, como pueden ser los tratamientos de altas presiones hidrostáticas y la presencia de Ca-DPA exógeno, entre otros. Estos agentes intervendrían en distintas fases de la germinación, sorteando la vía de germinación habitual, es decir, la germinación por nutrientes. Sin embargo, todavía se desconocen muchos aspectos tanto de la germinación por nutrientes, como la desencadenada por otros agentes. En esta sección se estudió la posible inducción de la germinación mediante exposición a nutrientes, a acidez, a CaDPA, a altas presiones, a PEAV y a radiaciones UV. Seguidamente se obtuvieron datos acerca de los eventos celulares que ocurren durante la exposición de los esporos a todos estos agentes, y se realizaron las comparaciones correspondientes.

En todos los casos, los experimentos se llevaron a cabo a 25°C excepto cuando se indica lo contrario en el texto. En ningún caso se activaron térmicamente los esporos de manera previa a la exposición al estímulo germinante.

4.4.1. Germinación con nutrientes

Como se ha comentado, la germinación con nutrientes sería la forma habitual de germinación de los esporos, es por ello que en este estudio se tomó como referencia. Dado que los nutrientes eficaces son dependientes del microorganismo, incluso depende de la cepa empleada, en primer lugar se hizo una exploración, realizando un barrido con varios de ellos para seleccionar el más adecuado. Este estudio se realizó midiendo el descenso de la densidad óptica, ya que se trata de una forma rápida de medir la velocidad de germinación.

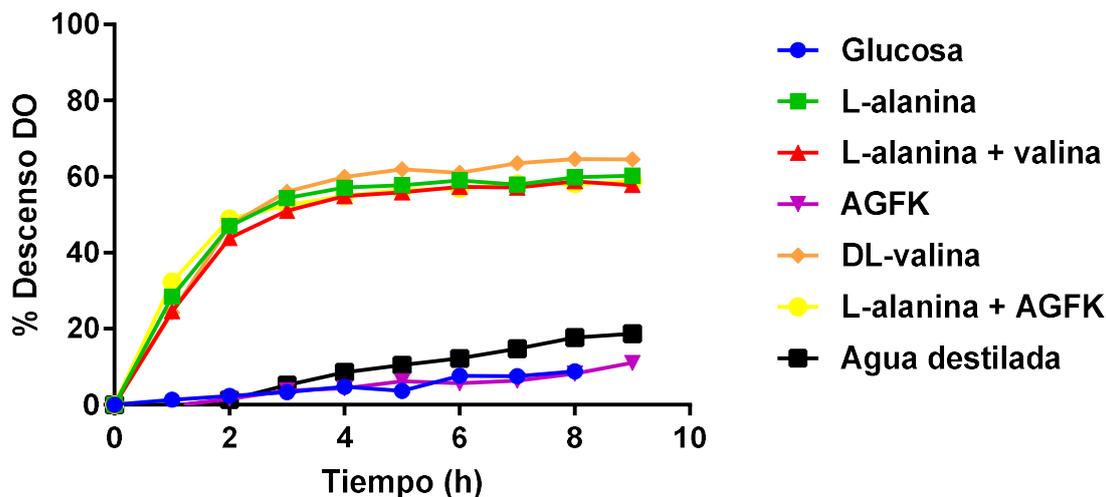


Figura 4.4.1. Evolución de la germinación de *B. subtilis* con varios nutrientes midiendo el descenso en densidad óptica (600 nm).

Los resultados obtenidos en este experimento (Figura 4.4.1) mostraron que no todos los nutrientes empleados eran capaces de desencadenar la germinación en esta cepa. Mientras que los aminoácidos L-alanina y DL-valina resultaban muy eficaces, llegando hasta un 60% de descenso en densidad óptica, con glucosa y con la combinación de asparagina, glucosa, fructosa y KCl (AGFK) apenas descendía la densidad óptica, al menos, en los tiempos estudiados. Estos resultados son opuestos a los encontrados en la bibliografía, en los que tanto la glucosa como la combinación AGFK se consideran buenos inductores de la germinación en *B. subtilis* (Moir y Smith, 1990; Setlow, 2003). Esto puede deberse a que nuestra cepa sea deficitaria en algún receptor de la germinación concreto, ya que en la germinación desencadenada por nutrientes participan una serie de receptores específicos de cada compuesto. Por ejemplo, en la germinación inducida por L-alanina es necesario el receptor gerA, mientras que la combinación de nutrientes AGFK se necesitan los receptores gerB, gerK y fruB (Moir y Smith, 1990). Es necesario además tener en cuenta que en nuestros experimentos no se activaron los esporos térmicamente de manera previa a la exposición a nutrientes.

Atendiendo al hecho de que cada nutriente desencadena la germinación a través de unos receptores diferentes, finalmente se decidió utilizar, para los estudios de germinación con nutrientes, caldo nutritivo con extracto de levadura (CNYE), puesto que se trata de un medio de cultivo complejo con gran variedad de nutrientes, por lo que

podríamos conseguir inducir la germinación de manera más constante, en un mayor número de esporos, en cepas de diferente genética, y bajo condiciones experimentales diversas. La Figura 4.4.2 muestra la comparación del descenso de densidad óptica de esporos de *B. subtilis* en CNYE y en DL-valina tras 1, 2 y 3 horas de incubación. Como se puede observar en la Figura, la germinación en CNYE era más rápida inicialmente, pero a partir de las 3 horas comenzaba a observarse una estabilización en la DO (datos no mostrados), probablemente debido al inicio de la multiplicación de los esporos germinados, lo cual podría dificultar la interpretación de los resultados. Sin embargo, se comprobó mediante recuento en placa que el tiempo de estudio (máximo de 3 horas a temperatura ambiente de 25°C) era insuficiente para permitir la multiplicación, con lo cual se escogieron estas condiciones para los estudios posteriores.

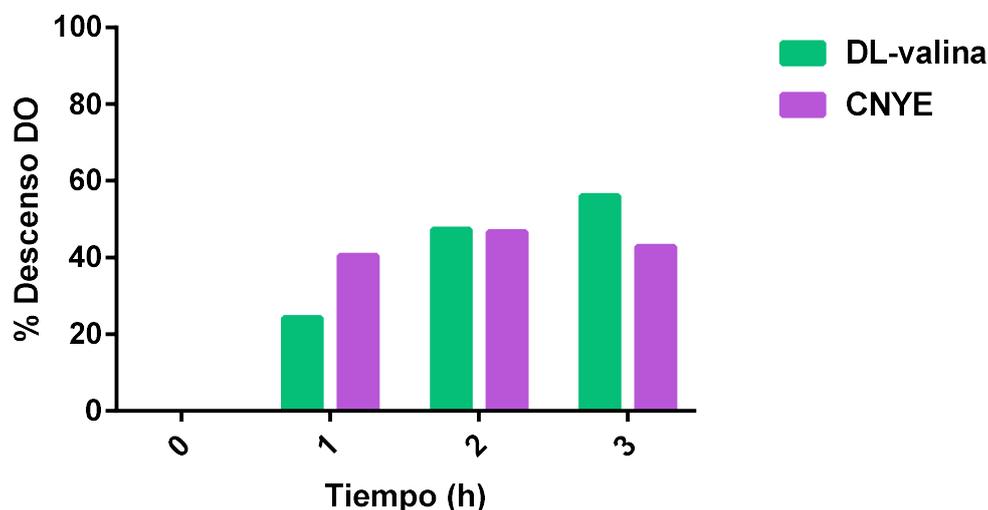


Figura 4.4.2. Comparación de la germinación con DL-valina (barras verdes) y con caldo nutritivo suplementado con extracto de levadura (barras moradas) midiendo el descenso en densidad óptica a 600 nm.

Con objeto de poder conocer mejor la fracción de la población que respondía a los nutrientes, se estudió la germinación mediante recuentos microbianos en placa, tanto recuento directo (antes de pasteurizar, AP), como tras una pasteurización posterior de 75°C durante 10 min (TP). Con la pasteurización se inactivarían aquellos esporos que hubiesen germinado, por lo que, mediante la diferencia entre ambos recuentos, se podría estimar el número de esporos germinados para cada tiempo de exposición al CNYE. La Figura 4.4.3 muestra un ejemplo representativo de una curva de germinación obtenida.

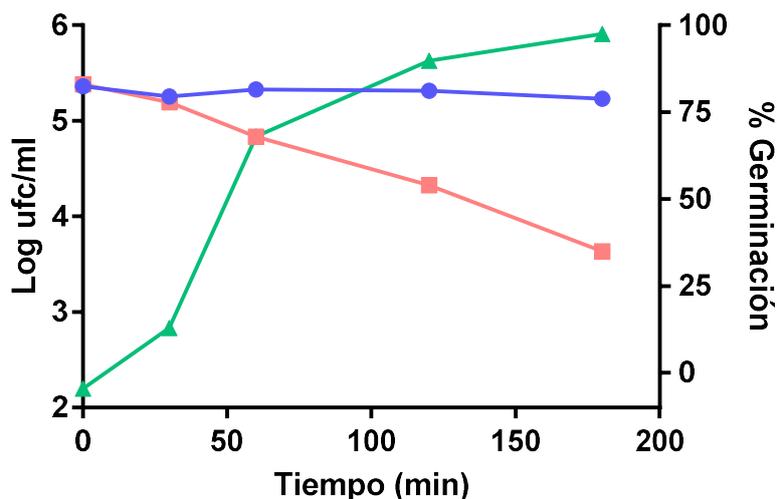


Figura 4.4.3. Estudio de la germinación en caldo nutritivo con extracto de levadura de *B. subtilis*. Recuento directo (AP) (●) y recuento obtenido tras una pasterización (TP) (75°C durante 10 minutos) (■). En el eje de la derecha se representa el % de germinación (▲).

Como se puede ver en la Figura 4.4.3, el recuento directo (círculos azules), se mantenía constante, como era previsible, puesto que el tiempo estudiado era insuficiente para permitir la multiplicación de los esporos germinados. Por otro lado, en rojo (cuadrados) se observa el descenso de recuento tras un tratamiento de pasterización, es decir, muestra cómo los esporos van adquiriendo sensibilidad al calor debido a su germinación. La diferencia entre ambas líneas permite el cálculo del porcentaje de esporos germinados del total de la población. Como se puede observar en la figura, el porcentaje de germinación aumentaba gradualmente con el tiempo de exposición a los nutrientes. Tras tres horas de exposición, el recuento TP se redujo casi dos ciclos logarítmicos, es decir, alrededor del 99% de los esporos había germinado en esas condiciones.

4.4.2. Germinación con Ca-DPA

Otra vía de inducción de la germinación es la exposición a DPA exógeno que, al igual que el endógeno, activa los enzimas líticos del córtex (Setlow, 2003). En el protoplasto del espora, el DPA se encuentra quelado, en proporción 1:1, con cationes divalentes, principalmente Ca^{2+} .

El dipicolinato cálcico es un compuesto presente únicamente en el protoplasto de los esporos. Durante la germinación, tras la unión de los nutrientes a los receptores, se produce su salida del protoplasto, lo que se ha descrito que activa el enzima lítico del córtex CwlJ. También el Ca-DPA exógeno es capaz de activar dicho enzima, iniciando la germinación en la fase II directamente sin necesitar la señal de inducción mediada por los germinantes nutritivos (Riemann y Ordal, 1961). Sin embargo, pese a que este sea el mecanismo más probable de actuación, no se ha conseguido demostrar hasta la fecha, y de hecho se ha propuesto que el Ca-DPA podría no actuar sobre el enzima CwlJ, sino sobre el peptidoglicano del córtex (Christie y Setlow, 2020), ya que se ha demostrado que el Ca-DPA no aumenta la actividad de dicho enzima *in vitro* (Wu y col., 2015). Tampoco se conoce con exactitud el mecanismo por el que se libera este compuesto del protoplasto del espora durante la germinación, aunque se cree que sería a través de los canales SpoVA, que son los mismos canales por los que entraría el Ca-DPA durante la esporulación. Estos canales se localizan en la membrana interna, al igual que los receptores de la germinación, lo que sugiere la importancia de la permeabilidad de esta envoltura en el comportamiento del espora.

En este estudio, en primer lugar, se realizó una exploración estudiando varias concentraciones de Ca-DPA para seleccionar la más adecuada (Figura 4.4.4).

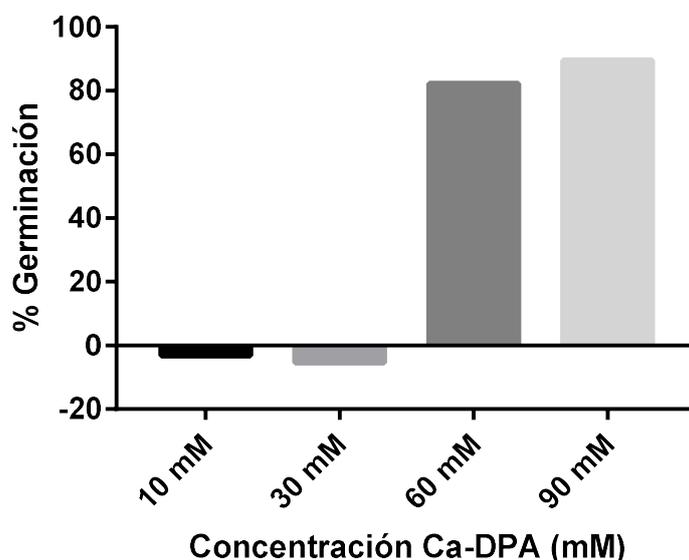


Figura 4.4.4. Porcentajes de germinación de esporos de *B. subtilis* tras exposición a varias concentraciones de Ca-DPA durante 180 minutos.

Como muestra la Figura 4.4.4, la exposición a concentraciones de 10 y 30 mM no indujeron la germinación incluso tras tres horas de exposición. Por el contrario, un elevado porcentaje de esporos germinó en presencia de 60 y 90 mM de Ca-DPA. Dado que las diferencias en cuanto a porcentaje de germinación observados entre 60 y 90 mM de Ca-DPA fueron muy pequeñas, se decidió seleccionar la concentración de 60 mM, por ser más frecuentemente empleada en la bibliografía (Magge y col., 2008; Paidhungat y col., 2001). Una vez seleccionada la concentración de Ca-DPA, se estudió la germinación a lo largo del tiempo de exposición. La Figura 4.4.5 muestra una curva típica de germinación de *B. subtilis*.

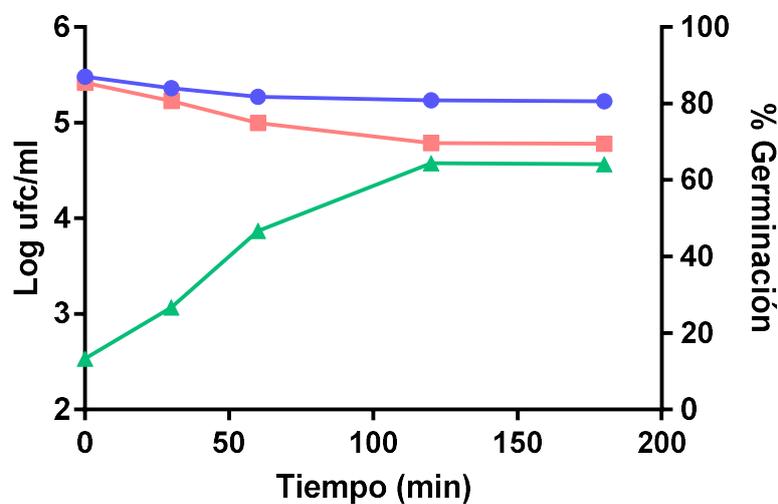


Figura 4.4.5. Estudio de la germinación de *B. subtilis* con Ca-DPA 60 mM: recuento antes de pasteurizar (●) y tras pasteurizar 75°C/10 min (■). En el eje de la derecha se representa el % de germinación (▲).

En este ejemplo, la exposición a Ca-DPA 60 mM no afectó al recuento directo de los esporos (AP), es decir, no se produjo inactivación, ni multiplicación. Pero sí que indujo la germinación en el 64% de los esporos, tras tres horas de exposición. Aparentemente este inductor de la germinación, aunque eficaz, sería menos eficiente que la activación por nutrientes dado que el porcentaje de esporos germinados se estabilizaba a partir de las dos horas, y el máximo alcanzado (Figura 4.4.5) era inferior al observado en caldo nutritivo (Figura 4.4.3).

4.4.3. Germinación con altas presiones hidrostáticas (HHP)

Esta tecnología ha demostrado ser eficaz en la inducción de la germinación de esporos. Se trata de una tecnología emergente empleada en la pasteurización de algunos alimentos, ya que es capaz de inactivar células vegetativas. Aunque el mecanismo de acción que lleva a la muerte celular no se conoce con exactitud, parece que podría afectar a varias estructuras, siendo los daños en la membrana un aspecto clave, al menos en las células vegetativas (Mañas y Pagán, 2005). Por otro lado, se ha observado que también puede causar la inactivación de esporos bacterianos, aunque se trata de un proceso más complejo. Parece que se trata de una tecnología que actuaría en dos fases, en la primera se produciría la germinación y posteriormente tendría lugar la inactivación (Gould y Sale, 1970). También se ha propuesto la aplicación simultánea de presiones ultraelevadas (>600 MPa) y temperaturas elevadas para inactivar esporos de diferentes géneros (Georget y col., 2014; Sevenich y Mathys, 2018).

Además, parece que las altas presiones hidrostáticas pueden desencadenar la germinación a través de dos vías. Cuando se emplean presiones bajas, en torno a 100 – 150 MPa, y hasta 300 MPa según algunos autores (Borch-Pedersen y col., 2017), la vía de germinación sería la activación de los receptores de la germinación, de forma similar a como lo hacen los nutrientes (Black y col., 2005), mientras que a presiones más elevadas (500-600 MPa) la germinación se induciría mediante un mecanismo diferente. Esta última vía se cree que podría actuar sobre los canales de Ca-DPA, produciendo la salida de este compuesto, así como de pequeñas moléculas (Vepachedu y col., 2007), lo que activaría los procesos de germinación. Se asume que a presiones intermedias podrían coexistir ambos mecanismos.

En esta investigación se emplearon varias presiones comprendidas entre 200 y 400 MPa. Las limitaciones del equipo utilizado no permitieron alcanzar presiones superiores a 400 MPa. La Figura 4.4.6 muestra curvas típicas de germinación obtenidas para *B. subtilis* en tampón de pH 7,0 y a tres presiones diferentes. La temperatura de tratamiento en este caso, comenzó a temperatura ambiente y se modificó a lo largo de la presurización debido al calentamiento adiabático, para después descender progresivamente. De los datos existentes en la bibliografía puede deducirse que este aumento de temperatura será de unos 3-4 °C cada 100 MPa; por tanto, en las condiciones experimentales empleadas en este estudio, en el peor de los casos, el aumento de temperatura podría ser de unos 16 °C.

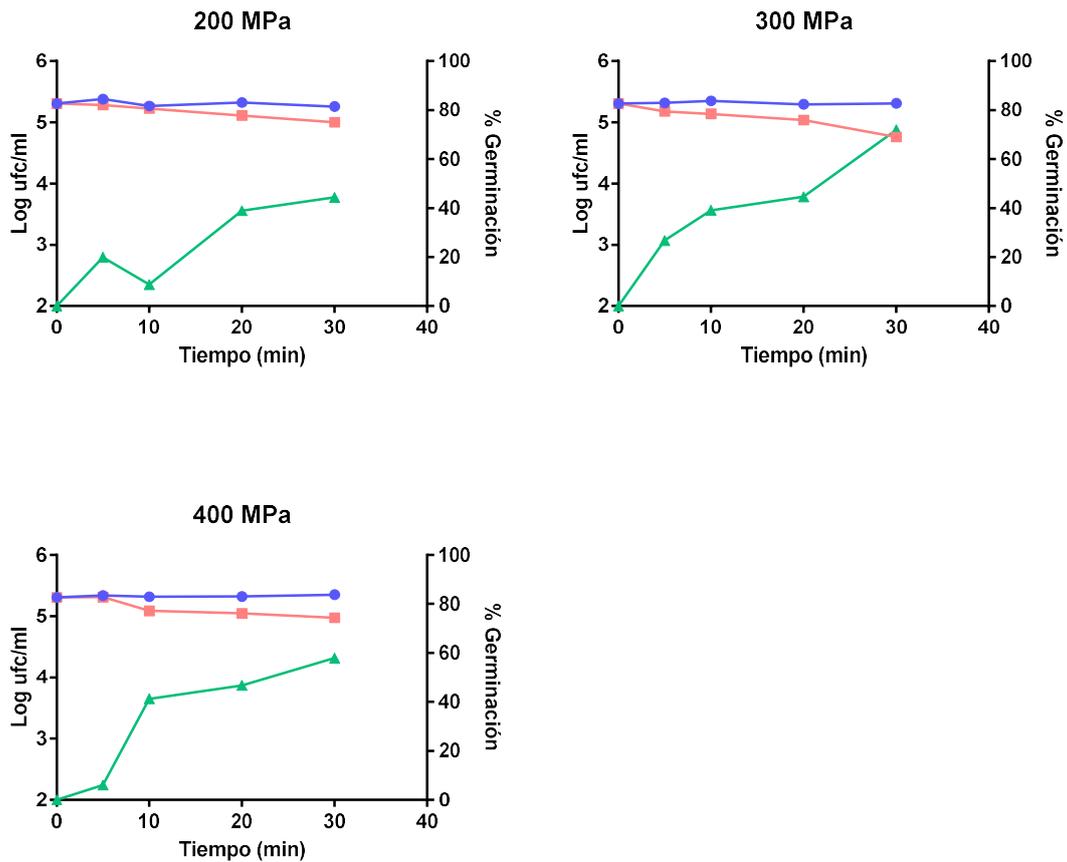


Figura 4.4.6. Curvas de germinación de *B. subtilis* en tampón McIlvaine a pH 7,0 con altas presiones hidrostáticas. Recuento antes de pasteurizar (●) y tras pasteurizar a 75°C/ 10 min (■); en el eje de la derecha se representa el porcentaje de germinación (▲).

Como se puede observar en la Figura 4.4.6, se produjo un incremento paulatino en el porcentaje de esporos que germinaban con el tiempo de exposición a las altas presiones. Los datos obtenidos no permiten concluir si existe alguna tendencia en relación a la presión utilizada, entre 200 y 400 MPa.

Se realizó también una exploración del efecto del pH en la germinación de *B. subtilis* por altas presiones (Figura 4.4.7).

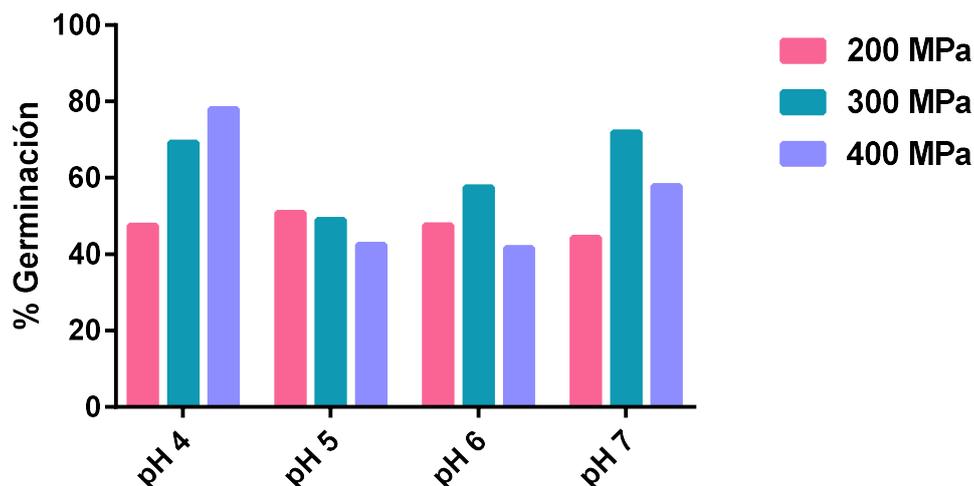


Figura 4.4.7. Estudio de la germinación de *B. subtilis* tras 30 minutos de tratamiento con altas presiones hidrostáticas a varias presiones y varios pHs.

Como se puede ver en la Figura 4.4.7, en los tratamientos a 200 MPa el pH no tuvo efecto en el porcentaje de esporos que germinaban. Sin embargo, a presiones más elevadas, la germinación fue mayor a pH 4,0 y 7,0, que a pH 5,0 y 6,0. Estos resultados difieren de los publicados en la bibliografía, en los que se observó que la germinación por altas presiones se inhibía a pHs bajos (<5) (Wuytack y Michiels, 2001). En cualquier caso, como se desprende de la figura, el porcentaje máximo de germinación obtenido, con las condiciones experimentales empleadas en este estudio, fue semejante al obtenido con dipicolinato cálcico y muy inferior al observado en caldo nutritivo.

La presión de tratamiento seleccionada fue 300 MPa, ya que fue la que consiguió mayor porcentaje de germinación a pH 7,0. Se prefirió utilizar este pH, en lugar de pH 4,0, para evitar posibles interacciones que dificultasen la interpretación de los resultados.

4.4.4. Germinación con HCl

Inicialmente, en este estudio se exploró el efecto de la concentración de HCl. La Figura 4.4.8 muestra curvas típicas de germinación obtenidas a tres concentraciones de HCl diferentes. En la Figura 4.4.9 se comparan los porcentajes de germinación obtenidos en cada condición.

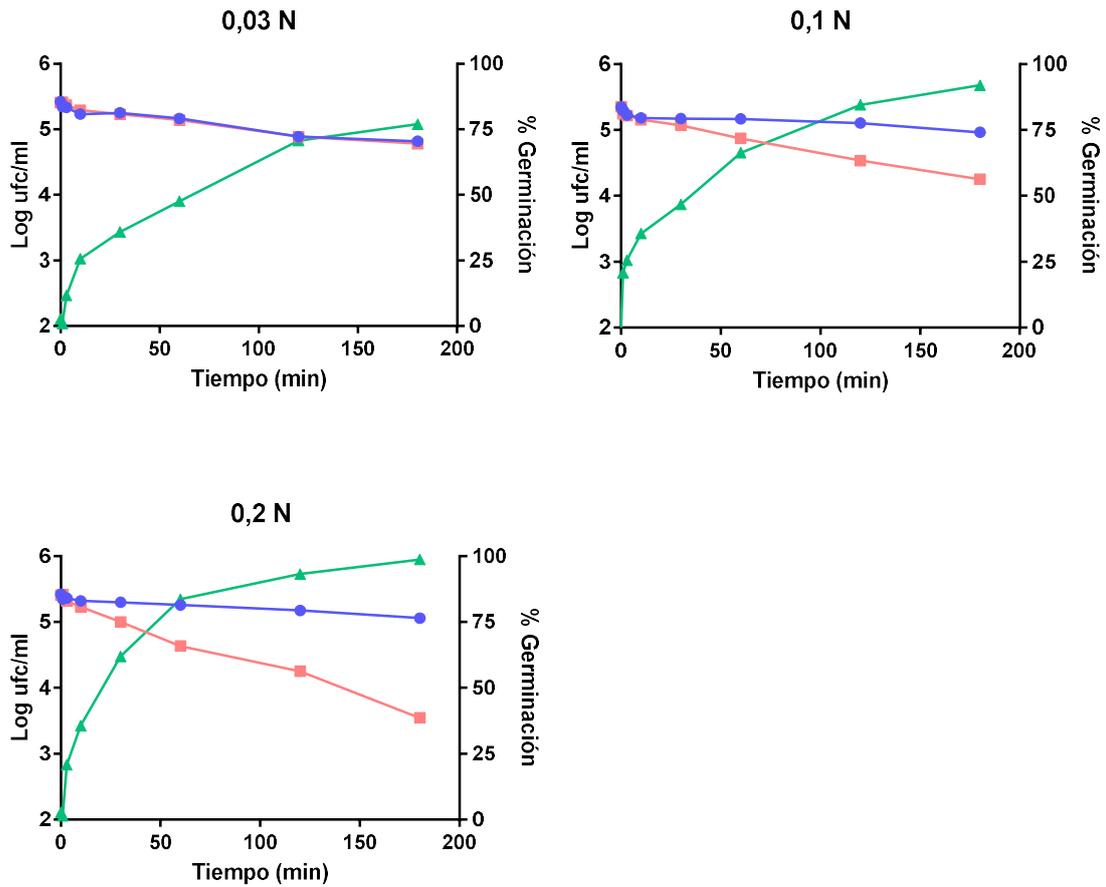


Figura 4.4.8. Curvas de germinación de *B. subtilis* con HCl 0,03 N, 0,1 N y 0,2 N. Recuento antes de pasteurizar (●) y tras pasteurizar a 75°C/ 10 min (■); en el eje de la derecha se representa el porcentaje de germinación (▲).

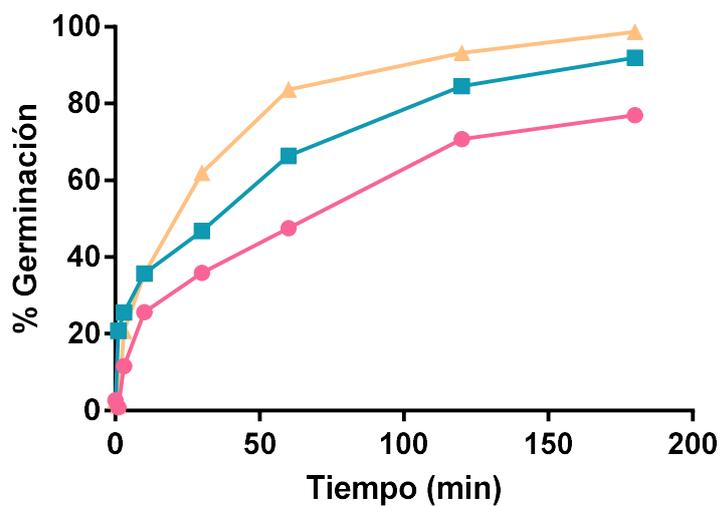


Figura 4.4.9. Efecto de la concentración de HCl en la germinación de *B. subtilis*: 0,03 N (●), 0,1 N (■) y 0,2 N (▲).

Como se puede observar en las Figuras 4.4.8 y 4.4.9, la velocidad de germinación fue dependiente de la concentración de ácido, siendo más rápida a la concentración más elevada, 0,2 N. Por otro lado, mientras que la exposición a concentraciones de 0,1 y 0,2 N inducía un porcentaje máximo de germinación similar, con la concentración más baja, 0,03 N, parece que el máximo se alcanzaba aproximadamente en el 75% de esporos germinados. En base a estos resultados, la concentración seleccionada para el resto de los análisis fue 0,1 N, ya que era una concentración igual a la utilizada previamente con *G. stearothermophilus* (capítulo 4.3 de esta Tesis), el comportamiento fue similar al obtenido con 0,2 N y, además, al producirse una germinación gradual, nos permitía evaluar mejor los posibles cambios fisiológicos que pudieran tener lugar. No obstante, cualquiera de las tres concentraciones hubiera sido adecuada para el objetivo de este estudio.

Por otro lado, se estudió el efecto de la temperatura de tratamiento en la germinación con HCl (0,1 N). Como se puede apreciar en la Figura 4.4.10, la velocidad de germinación fue similar en todos los casos. Sin embargo, cabe destacar que a 45 °C los esporos también se inactivaban en mayor magnitud (2,9 ciclos log tras tres horas de tratamiento), por lo que se rechazó esta temperatura, y se decidió emplear 25 °C, por cuestiones prácticas.

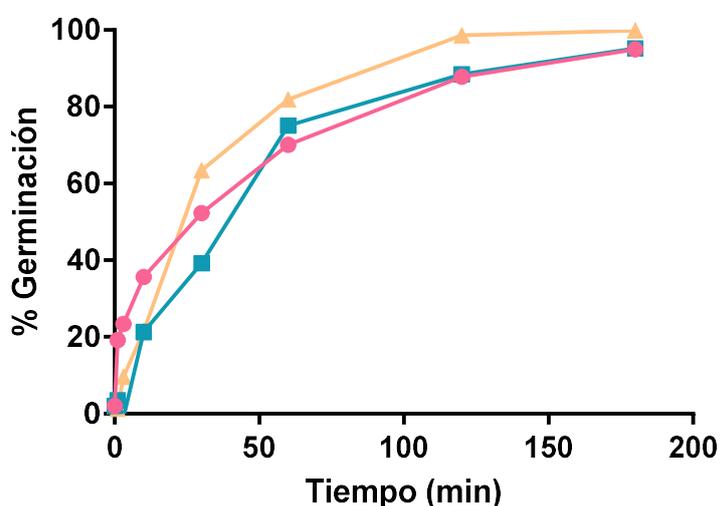


Figura 4.4.10. Efecto de la temperatura en la germinación de *B. subtilis* con HCl 0,1N: 25 °C (●), 37 °C (■) y 45 °C (▲).

La germinación inducida por exposición a ácidos no ha sido muy estudiada. En los años 60 y 70 se estudió el efecto de la combinación de calor con ácido, es decir tratamientos térmicos a bajos pHs en la activación de esporos y su posterior inactivación. En cuanto al efecto de la acidez a temperatura ambiente en la germinación, son varios los autores que han observado una menor capacidad de germinación en los esporos tratados con ácido (Rode y Foster, 1966). Parece que el mecanismo por el que esto ocurre podría estar relacionado con la lixiviación de iones que produce el tratamiento ácido, ya que si tras el tratamiento, se expone a los esporos a elevadas concentraciones de calcio, estos recuperan la capacidad para germinar (Rode y Foster, 1966).

Por otro lado, Lewis y col. (1960) propusieron la teoría del córtex contráctil, donde se asume que el bajo contenido en agua del protoplasto del espora se debe a la presión que ejerce el córtex sobre el interior, que hace salir el agua durante la maduración del espora. Esta teoría sería compatible con el hecho de que el peptidoglicano del córtex contiene un nivel bajo de enlaces cruzados (Popham y Bernhards, 2015), lo que le permite contraerse o expandirse en respuesta a cambios de pH o fuerza iónica. En este sentido, los tratamientos ácidos podrían producir el colapso del córtex, que redujera la presión que ejerce éste sobre el interior del espora, lo que podría aumentar la permeabilidad de la membrana interna, que es la barrera de permeabilidad más importante del espora. Se ha descrito que durante la esporulación, los lípidos de la membrana interna se comprimen y la envoltura se vuelve menos permeable a pequeñas moléculas y, durante la germinación, al tiempo en el que se hidroliza el córtex, se colapsa, recuperando la movilidad y por tanto, permitiendo el paso de moléculas (Cowan y col., 2004). Por tanto, durante los tratamientos ácidos, el bajo pH podría producir el colapso del córtex y, con ello, aumentar la permeabilidad de la membrana interna a diferentes moléculas. Al aumentar la permeabilidad, también podrían salir las moléculas del protoplasto y permitir la entrada de agua en él, con lo que se podría desencadenar la germinación.

4.4.5. Germinación con pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV)

Los pulsos eléctricos de alto voltaje es una tecnología emergente que actúa aumentando la permeabilidad de las envolturas celulares (membrana plasmática), mediante un proceso conocido como electroporación. Algunas aplicaciones de esta tecnología son la mejora de los procesos de extracción de compuestos intracelulares y la

inactivación microbiana. En estos tratamientos, cuando la intensidad de campo eléctrico a través de la membrana supera cierto umbral, se produce la permeabilización irreversible de la célula, lo que resulta en la liberación de los compuestos intracelulares y la lisis celular (Raso y col., 2014). Sin embargo, resulta poco eficaz frente a los esporos bacterianos (Lelieveld y col., 2007). Se ha descrito que los esporos latentes son resistentes a los pulsos eléctricos de alto voltaje, pero perderían dicha resistencia en el momento en que germinan (Hamilton y Sale, 1967). Cuando las envolturas externas se abren para permitir la salida de la nueva célula vegetativa, la membrana citoplasmática de la célula hija se vuelve susceptible de ser permeabilizada (Hamilton y Sale, 1967). Otros autores han observado el mismo efecto: Shin y col. (2010) apenas observaron 0,5 ciclos log de inactivación en esporos latentes de *B. subtilis*, incluso con elevada intensidad de campo eléctrico (40 kV/cm), tiempos de tratamiento prolongados (1000 μ s) y elevada temperatura (50 °C). Por otro lado, Marquez y col. (1997) describieron hasta cinco ciclos logarítmicos de inactivación en *B. cereus* con 50 pulsos y una intensidad de campo eléctrico de 50 kV/cm, y 3,4 ciclos logarítmicos en *B. subtilis* con 30 pulsos a la misma intensidad. Quizá esta mayor eficacia del tratamiento en la inactivación de esporos bacterianos se deba a la elevada intensidad de campo eléctrico empleada por Marquez y col. (1997). En cualquier caso, parece que los pulsos eléctricos de alto voltaje podrían producir daños en las capas externas de los esporos (Soni y col., 2016); si se aplican pulsos de corta duración, el esporo sería capaz de repararlos con el tiempo y sobrevivir, pero si se aplican pulsos de mayor duración, el daño causado podría ser irreparable, ocasionando su muerte (Barsotti y Cheftel, 1999; Soni y col., 2016).

Por otro lado, esta tecnología parece que también induciría la germinación de los esporos (Shin y col., 2010), aunque este aspecto ha sido mucho menos estudiado. Resulta razonable pensar que si los PEAV producen alteraciones en la membrana, podrían interferir, quizás inducir, los procesos de germinación. Así, en esta tesis estudiamos también el efecto de los pulsos eléctricos de alto voltaje en la germinación de *B. subtilis* (Figura 4.4.11). Se utilizó un campo eléctrico de 25 kV/cm, y temperatura ambiente.

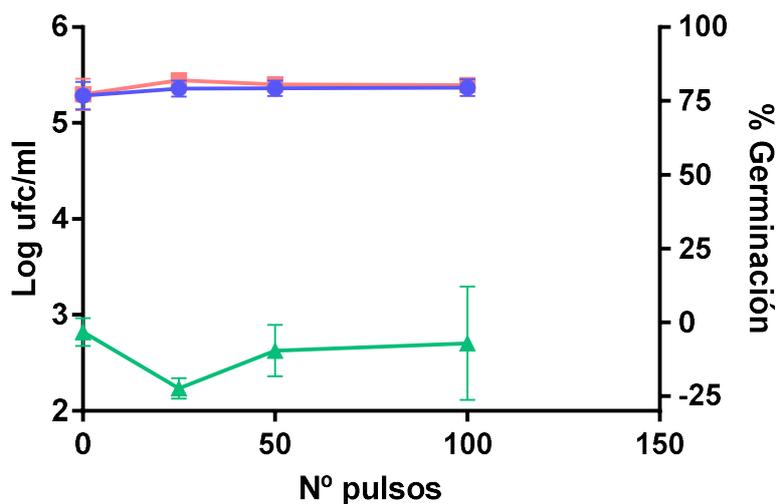


Figura 4.4.11. Estudio de la germinación de *B. subtilis* con PEAV 25 kV/cm a pH 7,0: recuento antes de pasteurizar (●) y tras pasteurizar a 75°C durante 10 min (■), y porcentaje de germinación (▲).

Como se aprecia en la Figura 4.4.11, con este tratamiento no se observó germinación, ya que la pasteurización posterior al tratamiento PEAV no inactivó ningún esporo. Estos resultados contradicen los resultados publicados por Shin y col. (2010), quienes observaron que el porcentaje de germinación aumentaba con el tiempo de tratamiento, es decir el número de pulsos, y también con la intensidad del campo eléctrico y con la temperatura de tratamiento. Quizá en nuestro caso no observamos germinación porque se utilizaron condiciones de tratamiento diferentes y menos agresivas: empleamos una intensidad de campo eléctrico inferior, un número de pulsos menor y los tratamientos se aplicaron a temperatura ambiente, y a pH neutro. Con objeto de aplicar condiciones de mayor intensidad, y siendo el pH un factor esencial en el comportamiento microbiano frente a la tecnología PEAV, se estudió también el efecto de los PEAV en la germinación cuando el medio de tratamiento tenía un pH 4,0 (Figura 4.4.12). De hecho en células vegetativas Gram positivas, de manera general, la acidez del medio reduce la resistencia a los PEAV (Lelieveld y col., 2007).

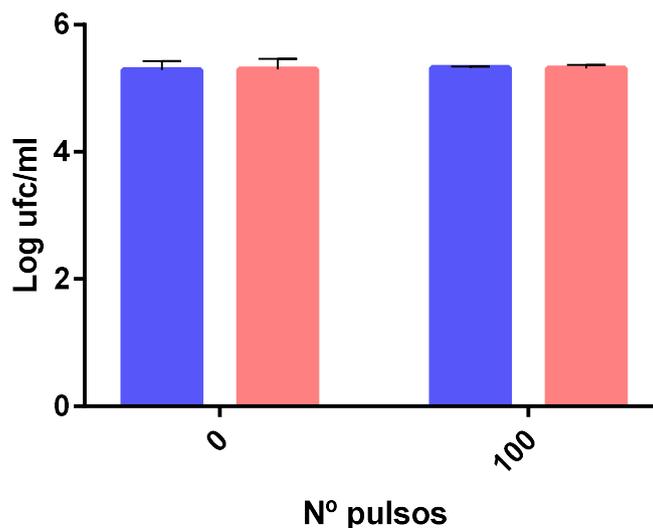


Figura 4.4.12. Estudio de la germinación en *B. subtilis* con PEAV 25 kV/cm a pH 4,0: recuento antes de pasteurizar (azul) y tras pasteurizar a 75°C durante 10 min (rojo).

Tampoco en condiciones ácidas se observó germinación en *B. subtilis* (Figura 4.4.12) en las condiciones experimentales empleadas en este estudio. Tampoco se apreció inactivación; es decir, los recuentos microbianos, tanto previos como posteriores a la pasteurización, permanecieron constantes, como en el caso de pH 7,0.

4.4.6. Germinación con radiación UV

La radiación UVC ha demostrado ser muy efectiva en la inactivación de bacterias, virus y hongos, por lo que es muy empleada en la desinfección de superficies. Las longitudes de onda empleadas en la industria alimentaria se encuentran entre 200 y 280 nm (Soni y col., 2016).

La diana celular de esta tecnología es el ADN, donde se forman compuestos que resultan letales para la célula si no son degradados. En los esporos se forma el fotoproducto 5-timidil-5,6-dihidrotimina, conocido comúnmente como fotoproducto de esporos (Reineke y Mathys, 2020). Este compuesto es menos letal que el que se produce en las células vegetativas, ya que durante la etapa de crecimiento del espora éste dispone de varios mecanismos de reparación capaces de degradarlo (Setlow, 2006). Uno de los aspectos que condiciona la formación de dicho fotoproducto, en lugar de los compuestos

generados en las células vegetativas, es la saturación del ADN del espora con las proteínas SASPs (Setlow, 2006). Es decir, las proteínas SASPs protegen el ADN del espora frente a la radiación ultravioleta, ya que favorecen la formación de productos menos dañinos que los que se generan en células vegetativas.

Por otro lado, el Ca-DPA se ha descrito como fotosensibilizante; es decir, este compuesto sensibiliza a los esporos frente a la radiación ultravioleta (Reineke y Mathys, 2020; Setlow, 2006), por lo que se ha descrito que, paradójicamente, los esporos durante la germinación, tras la liberación del Ca-DPA, podrían ser más resistentes frente a esta tecnología que los esporos latentes (Setlow, 2001; Setlow y Li, 2015).

Sin embargo, no nos consta que se haya descrito el efecto de esta tecnología en la germinación de los esporos, por lo que se decidió estudiar, al igual que en los casos anteriores, el efecto de la radiación ultravioleta en la germinación de *B. subtilis* (Figura 4.4.13).

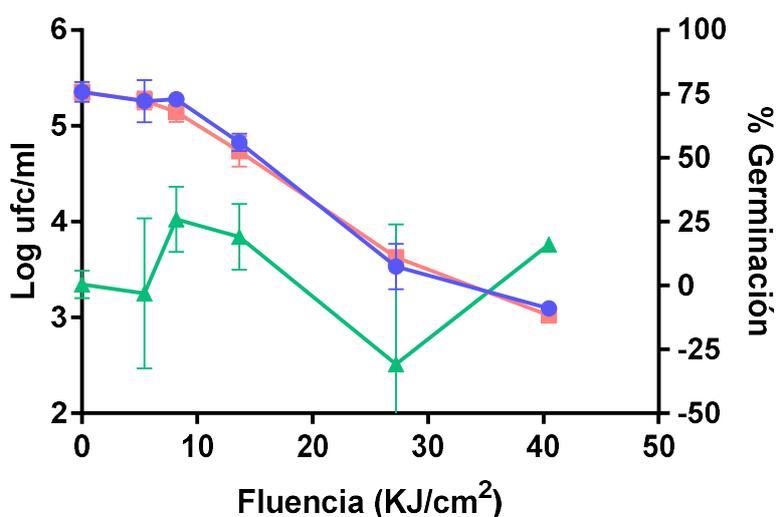


Figura 4.4.13. Estudio de la germinación de *B. subtilis* con UV a pH 7,0: recuento antes de pasteurizar (●) y tras pasteurizar a 75°C durante 10 min (■) y porcentaje de germinación (▲).

Como se puede apreciar en la Figura 4.4.13, la radiación ultravioleta no indujo la germinación en las condiciones ensayadas. Posiblemente ello se deba a que el modo de acción de esta tecnología está centrado muy específicamente en el ADN, por lo que era previsible que no tuviera efecto en las primeras fases de la germinación.

Por otro lado, la radiación ultravioleta sí que resultó eficaz en la inactivación de los esporos, incluso tras tiempos cortos de tratamiento, del orden de segundos (fluencias de entre 10 y 40 KJ/cm²).

4.4.7. Análisis de la heterogeneidad y la variabilidad del fenómeno de germinación por diversos agentes

La germinación es un proceso complejo en el que intervienen diferentes componentes, estructuras del espora y vías bioquímicas y metabólicas, por tanto, parece depender de las características de los esporos a nivel individual.

La germinación inducida por nutrientes se ha descrito como un proceso en dos fases, una fase previa, llamada T_{lag} , que sería la fase de latencia que se produce entre la adición de los nutrientes y el inicio de la liberación del Ca-DPA, y la liberación de Ca-DPA, que se produce rápidamente y muestra cinéticas sigmoideas (Zhang y col., 2013). El tiempo en el que cada espora se encuentra en la fase T_{lag} es variable, pudiendo durar entre menos de un minuto hasta varias horas, en idénticas condiciones ambientales (Zhang y col., 2013). Una de las posibles explicaciones de esta variabilidad fenotípica es el número de receptores de la germinación que poseen. Se ha observado que varía mucho entre individuos de una misma población (Zhang y col., 2010) y se ha descrito que la presencia de mayores cantidades de dichos receptores supone una respuesta más rápida (Cabrera-Martínez y col., 2003). Por otro lado, el exceso de producción de dichos receptores puede afectar también negativamente a la germinación (Cabrera-Martínez y col., 2003). Sin embargo, parece que las diferencias en el número de estos receptores no justificarían completamente la heterogeneidad en la germinación (Zhang y col., 2013), por lo que los esporos podrían disponer de otros mecanismos que producen dicha variabilidad.

Cabe destacar que la formación de esporos es un mecanismo sofisticado de resistencia a condiciones adversas que poseen algunas bacterias para garantizar la supervivencia de la población. Cuando las condiciones ambientales vuelven a ser favorables, los esporos inician la germinación y dan lugar a una nueva célula vegetativa y, por tanto, pasan a ser vulnerables frente a distintos agentes, tanto físicos como químicos. Además, los esporos no poseen la capacidad de adaptación al ambiente que poseen las células vegetativas, ya que carecen de metabolismo activo; por ello, el

mecanismo probable de adaptación a ambientes cambiantes que poseen podría ser la diversificación de fenotipos o diversificación de apuestas “*bet-hedging*” (Frentz y Dworkin, 2020; Setlow y col., 2017). De este modo, no todos los esporos de una población responderían a los mismos estímulos o no en el mismo momento ni con la misma intensidad, para asegurarse así que el conjunto de la población no entre en los procesos de germinación a la vez, por si las condiciones se volvieran adversas de nuevo. Este se cree que es el motivo por el que existe una gran heterogeneidad en la germinación e inactivación de los esporos y por lo que la estrategia de inducir la germinación, para después inactivarlos con tratamientos menos severos, ha probado ser muy compleja.

En la Figura 4.4.14 se representan los porcentajes de esporos germinados tras tiempos de exposición constantes frente al agente germinante. Los datos corresponden a la media de 6 réplicas de germinación con CNYE, 5 réplicas con Ca-DPA, 3 con HHP y 6 con HCl, y las barras de error representan la desviación estándar. Como se puede apreciar en la Figura, en el caso de la exposición a nutrientes, a CaDPA y a la acidez, la mayor parte de los esporos germinaron en la primera hora de tratamiento, mientras el porcentaje de esporos que germinaba fue reduciéndose a lo largo del tratamiento. Estos datos muestran que la germinación sigue una cinética asintótica, es decir, el porcentaje de esporos que germina a lo largo del tratamiento va disminuyendo, pero quizá siempre quede una pequeña fracción de esporos latentes por germinar. Únicamente en el caso de las HHP se observaron porcentajes similares tras tiempos de exposición constantes.

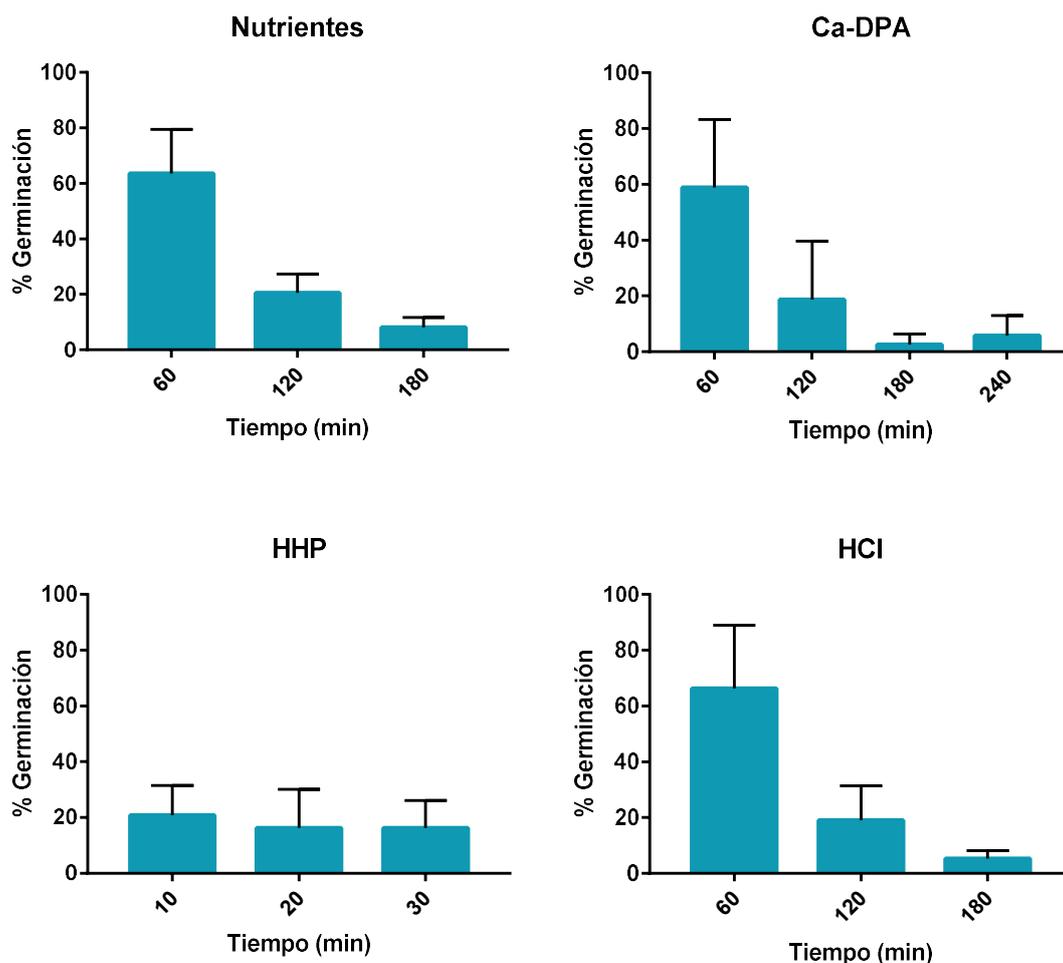


Figura 4.4.14. Porcentaje de esporos que germinan en intervalos de 60 minutos con nutrientes, Ca-DPA (60 mM) y HCl (0,1 N) y en intervalos de 10 minutos con HHP (300 MPa).

Por otro lado, en los estudios realizados en esta investigación se encontró gran variabilidad en la germinación inducida por los distintos agentes en la misma población microbiana (Figura 4.4.15 y Figura 4.4.16). La Figura 4.4.15 incluye las curvas de germinación por exposición a los cuatro agentes en las condiciones consideradas más eficaces, y la Figura 4.4.16, los ciclos Log de germinación tras tiempos de exposición crecientes al agente germinante. En ambos casos, los datos corresponden a la media de 6 réplicas de germinación con CNYE, 5 réplicas con Ca-DPA, 3 con HHP y 6 con HCl, y las barras de error representan la desviación estándar. Como se aprecia en las Figuras, parece que la variabilidad fue mayor en la germinación inducida por nutrientes y por HCl. Además, se encontró mayor variabilidad en la primera hora de tratamiento, mientras que, a partir de ese momento, como se puede observar en la Figura 4.4.14, la mayor parte de

los esporos ya había germinado. Estos datos muestran que, pese a que todos los esporos se exponen a la misma concentración de los inductores, y bajo las mismas condiciones medioambientales, no todos ellos parecen responder al mismo tiempo o con la misma intensidad.

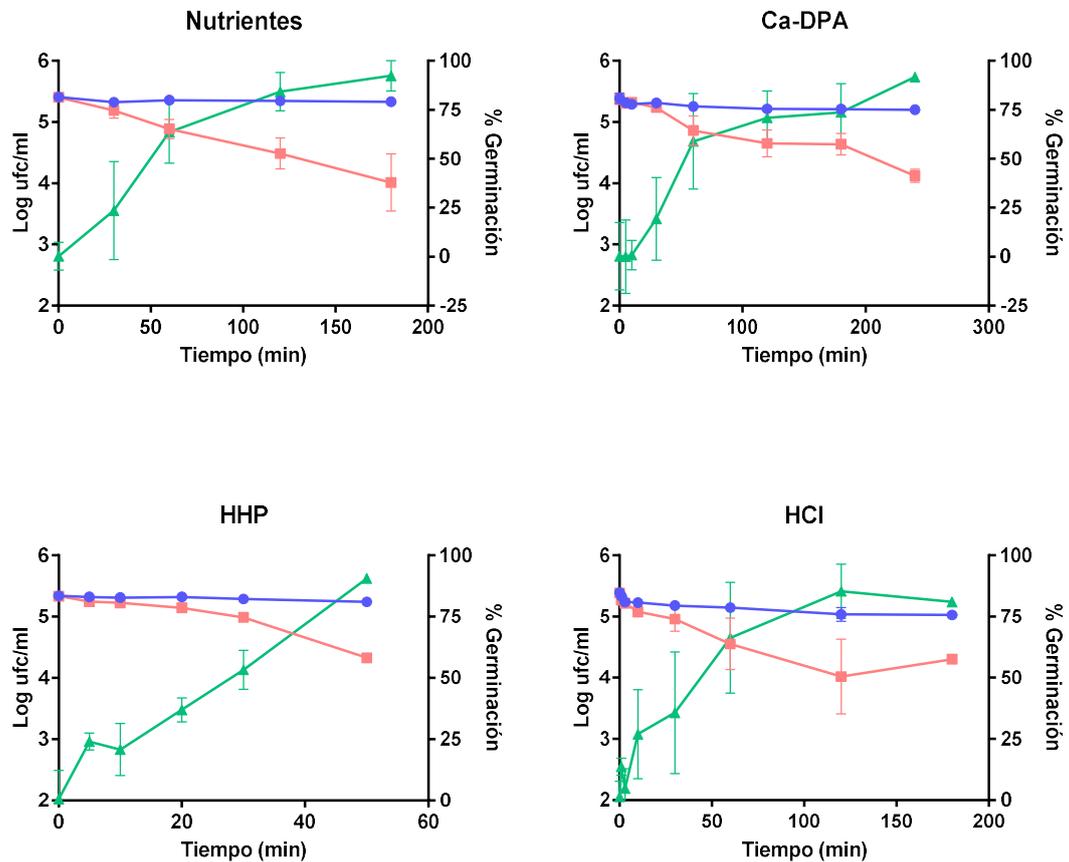


Figura 4.4.15. Estudio de la variabilidad en la germinación de *B. subtilis* con varios agentes: nutrientes, Ca-DPA (60 mM), HHP (300 MPa) y HCl (0,1 N).

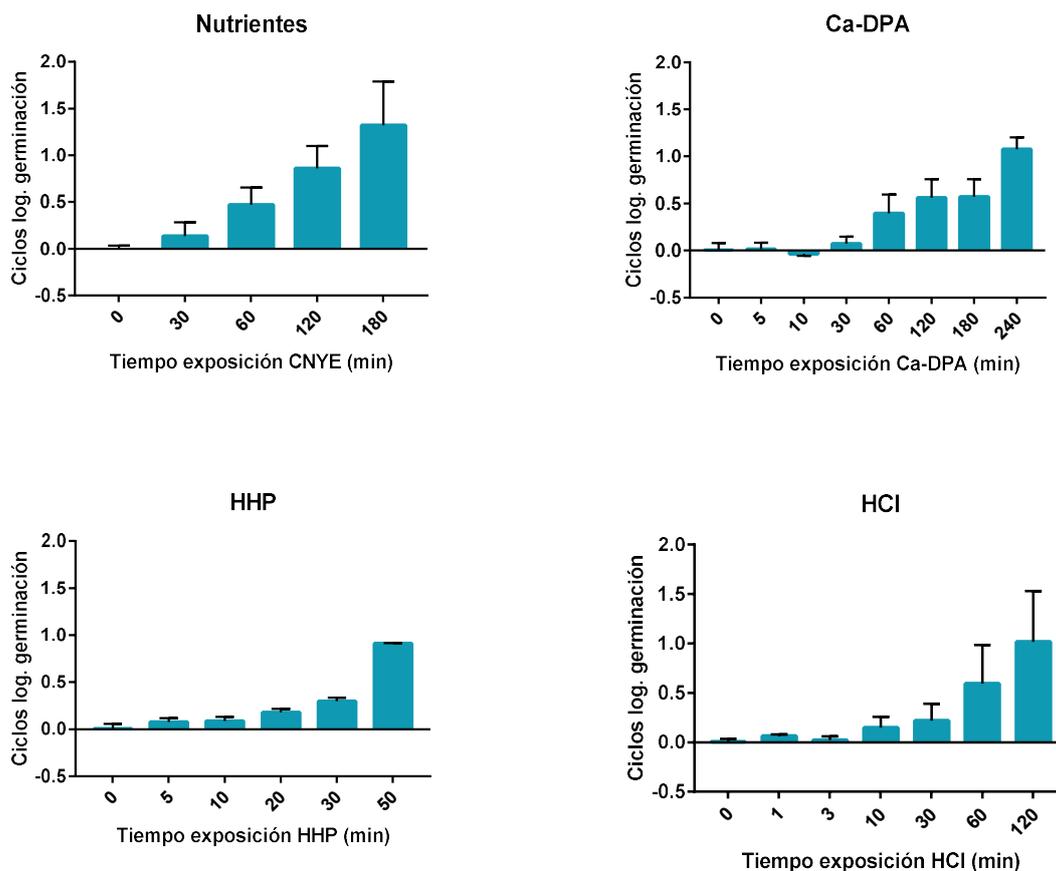


Figura 4.4.16. Ciclos de germinación de esporos de *B. subtilis* expuestos a: nutrientes, Ca-DPA (60 mm), HHP (300 MPa) y HCl (0,1 N).

4.4.8. Estudio comparativo de las características fisiológicas de los esporos germinados por los diferentes agentes

La germinación es un proceso complejo en el que se sabe que tienen lugar varios eventos a nivel celular y molecular, aunque no todos ellos se conocen con detalle. De hecho, hay algunos aspectos que tradicionalmente se habían aceptado y que recientemente se están cuestionando, como por ejemplo el momento en el que se inicia la síntesis de proteínas. Tradicionalmente se había establecido que no tenía lugar hasta la fase de desarrollo, la última fase de la germinación, sin embargo, Sinai y col. (2015) afirmaron que se iniciaba tras la salida de DPA, y que era necesaria para que la germinación tuviera lugar. Por otro lado, tampoco se sabe con certeza a través de qué canales se libera el DPA durante la germinación, ni cómo se produce la unión entre los nutrientes y los receptores y cómo esto desencadena el resto de eventos. En resumen, hay muchas lagunas de

conocimiento en relación a la germinación, por lo que en esta tesis se decidió estudiar los cambios que se producen en algunos aspectos fisiológicos que tienen lugar durante la germinación de *B. subtilis* iniciada por diversos estímulos.

Los aspectos que se estudiaron en esta tesis engloban fenómenos que se han asociado a distintas fases de la germinación. Por un lado, la fase I se midió a través del descenso en densidad óptica (DO) y la salida de DPA, mientras que el inicio de la fase II se estudió mediante la permeabilidad del córtex a un colorante específico, el Syto 16 y asumimos que la fase II se había completado, y utilizamos como indicador de germinación, cuando los esporos perdían su característica termorresistencia, es decir, cuando se inactivaban con un tratamiento fijo de pasterización, capaz de inactivar las células vegetativas. Es importante destacar que en la literatura científica no existe información precisa acerca del nivel de inactivación y/o de la intensidad del tratamiento térmico que se considera suficiente para distinguir un espora aún termorresistente de un espora ya termosensible, es decir, no se puede establecer un umbral claro que permita hacer esta distinción. De hecho, ocasionalmente se ha descrito que durante la fase I de la germinación ya se produce cierta pérdida de termorresistencia, debido a la hidratación parcial del protoplasto (Setlow y col., 2001; Setlow, 2013). Estos aspectos serán objeto de estudio en un capítulo posterior de esta Tesis Doctoral (Capítulo 4.5).

De forma adicional se estudió la permeabilidad de la membrana interna, mediante la tinción con yoduro de propidio (IP), ya que se ha descrito como la barrera de permeabilidad más importante que poseen los esporos (Cowan y col., 2004).

Cabe destacar la enorme dificultad que entrañan estos estudios, debido a, como se ha descrito en la sección anterior, la heterogeneidad y variabilidad encontrada en la germinación, lo que dificulta la interpretación de los resultados. Por otro lado, el pequeño tamaño de los esporos dificulta e incluso impide la utilización de determinadas técnicas, como la citometría de flujo, que produce resultados mucho más robustos para células de mayor tamaño, razón por la cual en este trabajo se hubo de optar por la microscopía de fluorescencia, mucho más laboriosa. Los detalles de optimización de las tinciones de fluorescencia se incluyen en el capítulo 4.1 de esta Tesis Doctoral.

Germinación por nutrientes

En la Figura 4.4.17A se muestran los resultados correspondientes a tres réplicas independientes. Como se ha comentado anteriormente, la variabilidad en las réplicas individuales dificulta el tratamiento estadístico y la interpretación de los datos presentados, por ello, y con objeto de mostrar el comportamiento con mayor claridad, en la Figura 4.4.17B se muestran los resultados correspondientes a una sola réplica, representativa del comportamiento observado. El % de germinación incluido en las figuras corresponde al % de esporos que pierden la resistencia al tratamiento de pasterización (75°C/10 min).

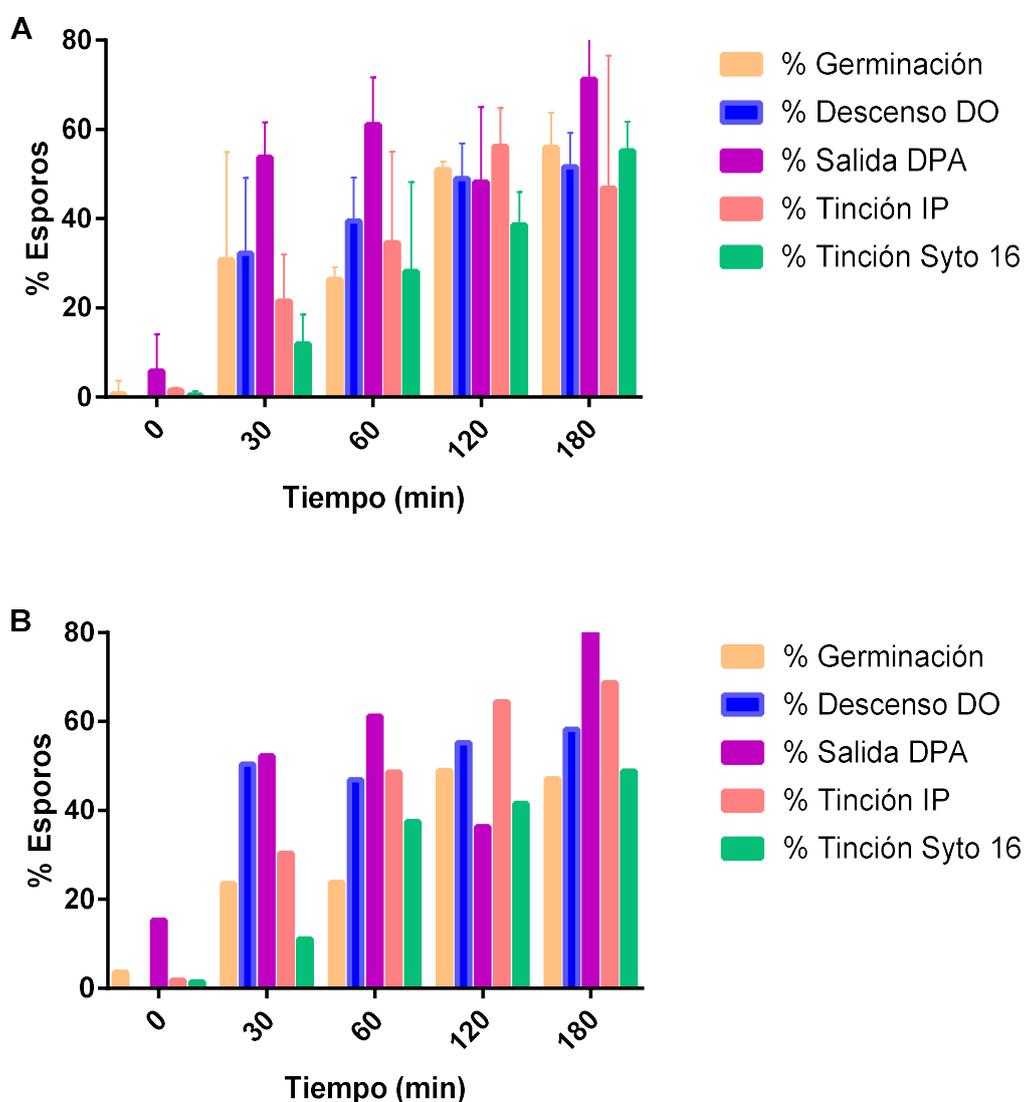


Figura 4.4.17. Estudio fisiológico de la germinación de *B. subtilis* con nutrientes de tres réplicas (A) y una sola réplica representativa (B).

Como se aprecia en la Figura 4.4.17, todos los parámetros estudiados se incrementaron con el tiempo de exposición a los nutrientes. Los resultados obtenidos sugieren que el descenso en densidad óptica y la salida de DPA serían los eventos que primero tienen lugar en la germinación, ya que tras 30 y 60 minutos, se obtuvieron porcentajes muy elevados en estos dos parámetros. Esto está en concordancia con lo encontrado en la bibliografía, dado que son los cambios que se producen en la fase I de la germinación (Paidhungat y Setlow, 2002; Setlow y col., 2003). Por otro lado, la pérdida de termorresistencia (indicado como % de germinación en las figuras), pese a que en un inicio habíamos considerado que sería un indicativo de la germinación en una fase avanzada, final de la fase II, los resultados observados sugieren que podríamos estar detectando el final de la fase I, es decir, cuando el protoplasto se ha hidratado parcialmente (Setlow y col., 2001; Setlow, 2013), ya que la pérdida de termorresistencia observada se producía de forma rápida y relacionada con los eventos de la fase I.

Por otro lado, la tinción con Syto 16, que detecta la hidrólisis del córtex, y por tanto la fase II, fue un proceso más lento, es decir se inició más tarde, como cabía esperar en base a la información recogida en la bibliografía. No obstante, cabe destacar que nuestros resultados sugieren que para que la tinción tenga lugar, sería necesario un elevado grado de hidrólisis del córtex.

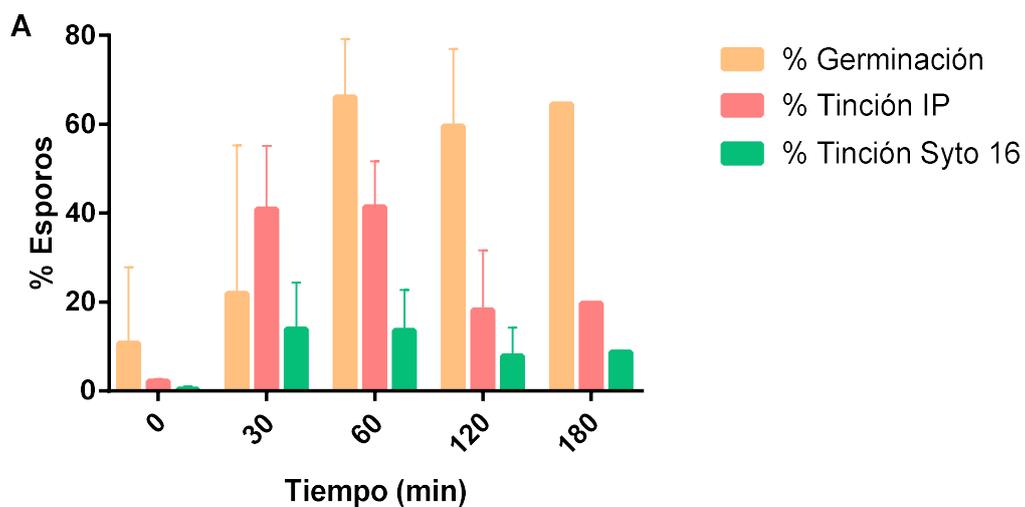
Por último, se observó también un relativamente elevado porcentaje de esporos teñidos con yoduro de propidio, que, en la mayoría de los casos, aumentaba progresivamente con el tiempo de exposición a los nutrientes, dentro del tiempo utilizado. Esta observación sugiere que la membrana interna de los esporos se permeabilizaría durante la germinación, y además de forma previa a la hidrólisis del córtex, o al menos, de forma previa a la tinción con Syto 16. Se trata de un aspecto que no ha sido descrito hasta la fecha, ya que de forma habitual se considera que la tinción con yoduro de propidio tiene lugar cuando la célula ha perdido la viabilidad.

Una posible explicación al fenómeno de permeabilización de la membrana interna durante la germinación podría ser que, para que se produzca la salida de los compuestos del interior del protoplasto, sea necesaria cierta permeabilización de dicha envoltura. Es decir, quizá la liberación de Ca-DPA no se produzca por los canales SpoVA, como ha sido sugerido (Setlow y col., 2017), pero no demostrado, o bien, dichos canales no serían específicos de este compuesto y permitirían la salida y entrada de otras moléculas. No obstante, la tinción con IP sucedía posteriormente a la salida de los compuestos de

pequeño tamaño molecular del interior del protoplasto. Ello quizá se deba a que este colorante tiene un mayor peso molecular (668,40 Da).

Una hipótesis que se podría desprender de los resultados obtenidos en este estudio sería que, en primer lugar, los nutrientes activasen de alguna manera los receptores de la germinación, lo que podría producir cierta permeabilización de la membrana interna, permitiendo la salida de DPA y cationes divalentes y la entrada de algo de agua (por lo que los esporos perderían termorresistencia). Posteriormente, el DPA del protoplasto activaría los enzimas líticos del córtex, lo que degradaría esta envoltura y permitiría la expansión de la membrana interna, provocando su permeabilización (permitiendo la entrada de IP). En este punto, los esporos recuperarían la actividad metabólica y empezarían la etapa de desarrollo, dando como resultado nuevas células vegetativas.

Germinación por CaDPA



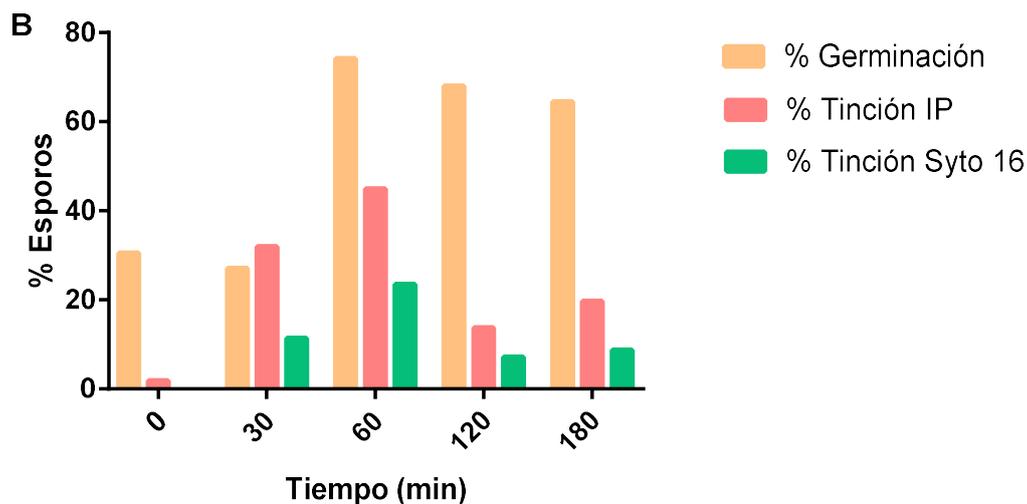


Figura 4.4.18. Estudio fisiológico de la germinación de *B. subtilis* con Ca-DPA (60 mM): cuatro réplicas (A) y una réplica representativa (B).

En cuanto a la germinación inducida por Ca-DPA, cabe destacar que no pudo medirse el descenso de densidad óptica a partir de 60 minutos porque se formaban precipitados que alteraban las medidas. Tampoco en este caso se determinó la liberación de DPA, por interferencia del propio compuesto que se añadía de manera exógena. Por esta razón estas medidas no aparecen en las figuras.

Los resultados muestran que en este caso, y, al contrario de lo esperado, la tinción con Syto 16 era de pequeña magnitud, aunque sí se apreció tinción en una pequeña fracción de los esporos. Es decir, al menos a través de la entrada de este colorante, no se pudo evidenciar la hidrólisis masiva del córtex, lo cual es difícil de explicar, ya que se asume que la germinación inducida por CaDPA induce la degradación del córtex. Por otro lado, se observó un rápido incremento de la tinción con IP, lo que indicaría permeabilización intensa de la membrana, pero tras tiempos prolongados de exposición al CaDPA, 120 minutos, este efecto revertía. Esto podría deberse a que el material genético de los esporos cambiase de conformación por efecto del tratamiento, lo que modularía la unión del colorante. No podemos descartar que esto mismo estuviese ocurriendo con el colorante Syto 16.

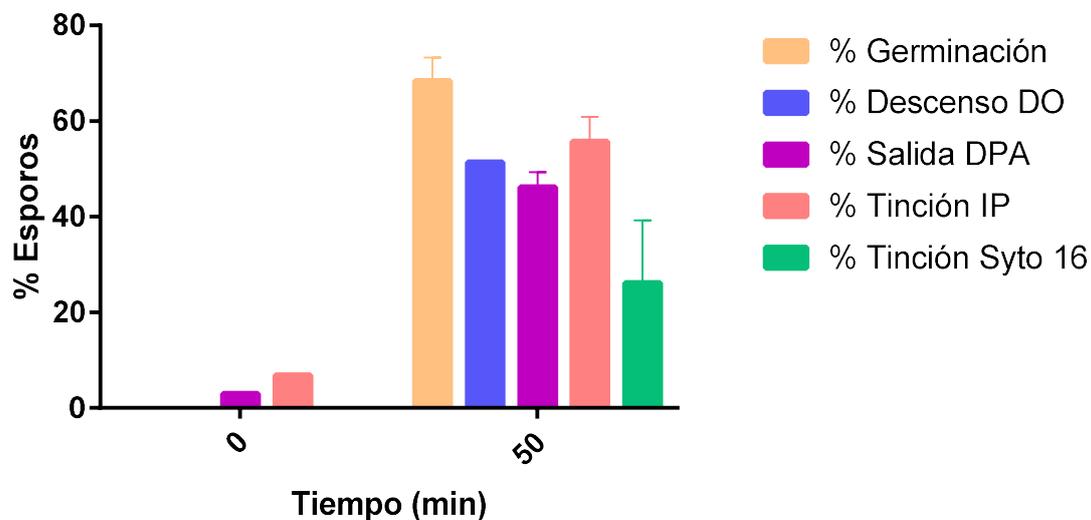
Germinación por altas presiones hidrostáticas

Figura 4.4.19. Estudio fisiológico de la germinación con altas presiones hidrostáticas (300 MPa) en *B. subtilis*.

La Figura 4.4.19 muestra los resultados de los tratamientos con altas presiones; en este caso, se utilizó únicamente el tiempo de tratamiento más prolongado, dado que el porcentaje de germinación obtenido fue, bajo las condiciones experimentales utilizadas (300 MPa, pH 7,0, durante 50 minutos), menor que en el resto de agentes germinantes estudiados. En cualquier caso, el patrón de cambios celulares observado en los esporos germinados por altas presiones fue similar al observado en la germinación por nutrientes (Figura 4.4.16). Esto podría estar indicando que a la presión utilizada, los esporos estaban germinando predominantemente a través de la activación de los receptores de nutrientes.

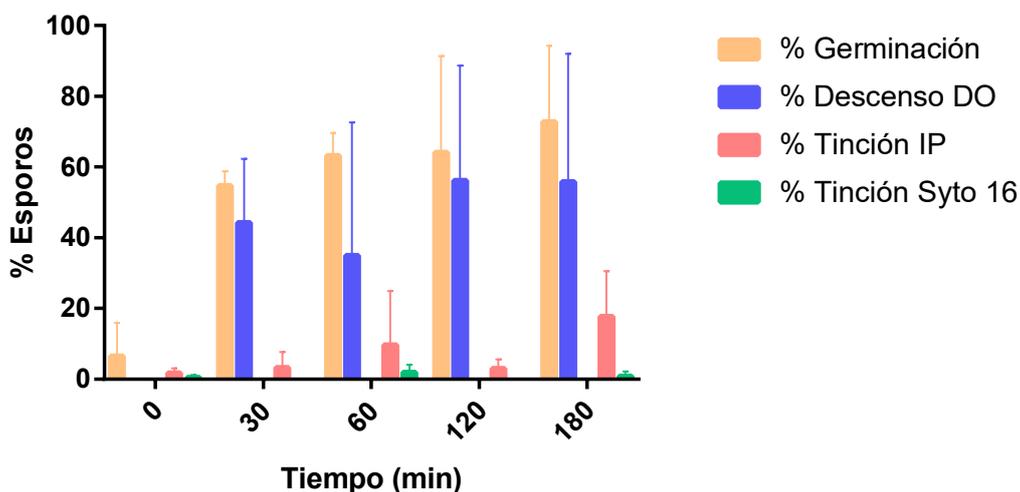
Así, en este caso también, los resultados obtenidos sugieren que existe una relación entre el descenso de densidad óptica, la salida de DPA y la tinción con IP, por lo que el tratamiento podría producir la permeabilización de la membrana interna y así permitir la liberación de las moléculas del protoplasto. También en células vegetativas parece que una de las dianas de esta tecnología es la membrana citoplasmática (Mañas y Pagán, 2005).

Por otro lado, parece que lo que se produce en mayor medida es la pérdida de termorresistencia, aunque este evento estaría relacionado con los anteriores, ya que la sensibilización al calor se debería a la entrada de agua en el protoplasto. Por último, en

estas condiciones, a diferencia del caso de la germinación con nutrientes, no se observó un grado elevado de tinción con Syto 16, lo que implica que el tratamiento no produciría la hidrólisis del córtex de todos los esporos que germinan. Quizá este fenómeno se deba simplemente a que se necesita más tiempo para que el córtex se hidrolice por completo y permita la entrada del colorante. Como se ha mencionado anteriormente, parece que la tinción con Syto16 requeriría un elevado grado de afectación del córtex.

Germinación por HCl

Tampoco en los tratamientos con HCl se observó tinción con Syto 16, en este caso, ni siquiera se tiñó el 5% de los esporos (Figura 4.4.20). Quizá se deba a que cuando los esporos se tratan con ácido, estos quedan bloqueados en la fase I de la germinación durante un tiempo, es decir, no es inmediato. En este caso no fue posible determinar la salida de DPA mediante espectroscopía, lo que parece indicar que la acidez afectaba en las medidas, incluso si se neutralizaba antes de la lectura. Este aspecto se estudió con más profundidad mediante una técnica fluorimétrica de determinación del DPA, como se detalla más adelante en este capítulo.



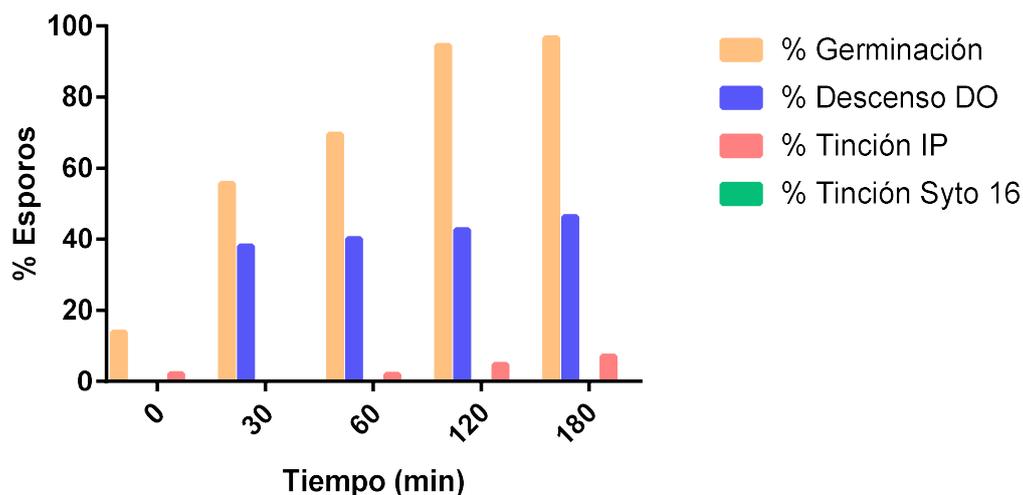


Figura 4.4.20. Estudio fisiológico de la germinación de *B. subtilis* con HC (0,1 N): tres réplicas (A) y una réplica representativa (B).

Como muestra la Figura 4.4.20, los tratamientos ácidos produjeron una rápida pérdida de termorresistencia (indicador de germinación); tras 30 minutos el 50% de los esporos se mostró termosensible. Además, la pérdida de densidad óptica mostró una cinética similar. Estos eventos sugieren que los esporos alcanzan la fase I de la germinación rápidamente tras la exposición a HCl. Sin embargo, en este caso apenas se observó tinción ni con yoduro de propidio ni con Syto 16. Estas observaciones parecen indicar que la germinación inducida por acidez podría ser un fenómeno químico rápido en el cual no se producirían apenas cambios celulares. Es importante reseñar que se comprobó que la tinción mediante los dos colorantes de fluorescencia utilizados, IP y Syto16, era igualmente muy baja cuando se neutralizaba el medio de manera previa a la tinción (datos no mostrados), lo cual nos permite descartar una interferencia metodológica de la acidez.

Pulsos eléctricos de alto voltaje y radiación ultravioleta

Por otro lado, con los tratamientos con pulsos eléctricos de alto voltaje, no se observaron cambios fisiológicos en los esporos, como cabía esperar, ya que no indujeron la germinación de los esporos, ni su inactivación (Figura 4.4.21).

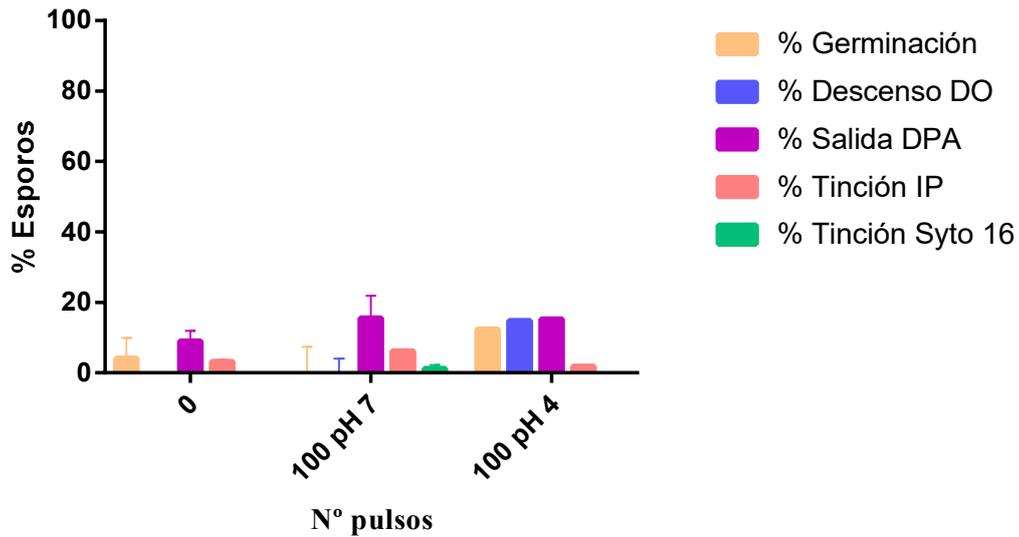


Figura 4.4.21. Estudio fisiológico de la germinación de *B. subtilis* tratado con pulsos eléctricos de alto voltaje (25Kv, pH 7,0 y pH 4,0).

Por último, en el caso de los tratamientos con radiación ultravioleta, tampoco se observaron cambios fisiológicos (Figura 4.4.22), a pesar de que en este caso, sí que se producía la inactivación del 97-98 % de los esporos.

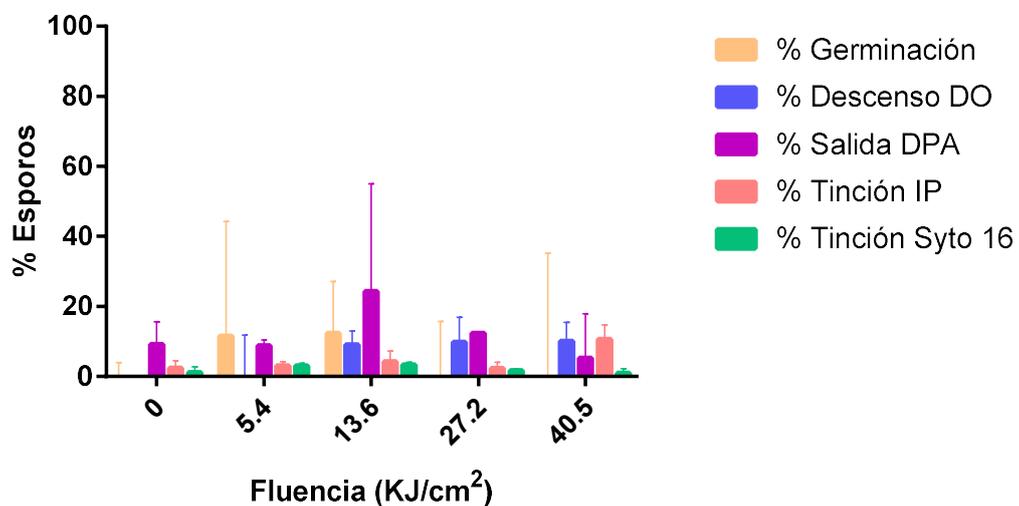


Figura 4.4.22. Estudio fisiológico de la germinación de *B. subtilis* tratado con radiación ultravioleta (254 nm).

Adicionalmente y de forma posterior a estos estudios, gracias a la reciente adquisición por parte del grupo de investigación de un fluorímetro capaz de excitar a longitudes de onda en la región de ultravioleta, se decidió determinar la salida de DPA

mediante su unión con $TbCl_3$, que da lugar a complejos Tb-DPA que producen fluorescencia. Esta metodología permite detectar el compuesto de forma más selectiva que la empleada anteriormente, ya que en las gráficas anteriores las medidas podrían estar sobrevaloradas debido precisamente a la menor especificidad. Estos estudios se realizaron en el caso de la germinación con nutrientes y acidez, en el caso del Ca-DPA no fue posible determinarlo por interferencias con el propio germinante. La Figura 4.4.23 muestra los datos de la germinación con nutrientes y acidez.

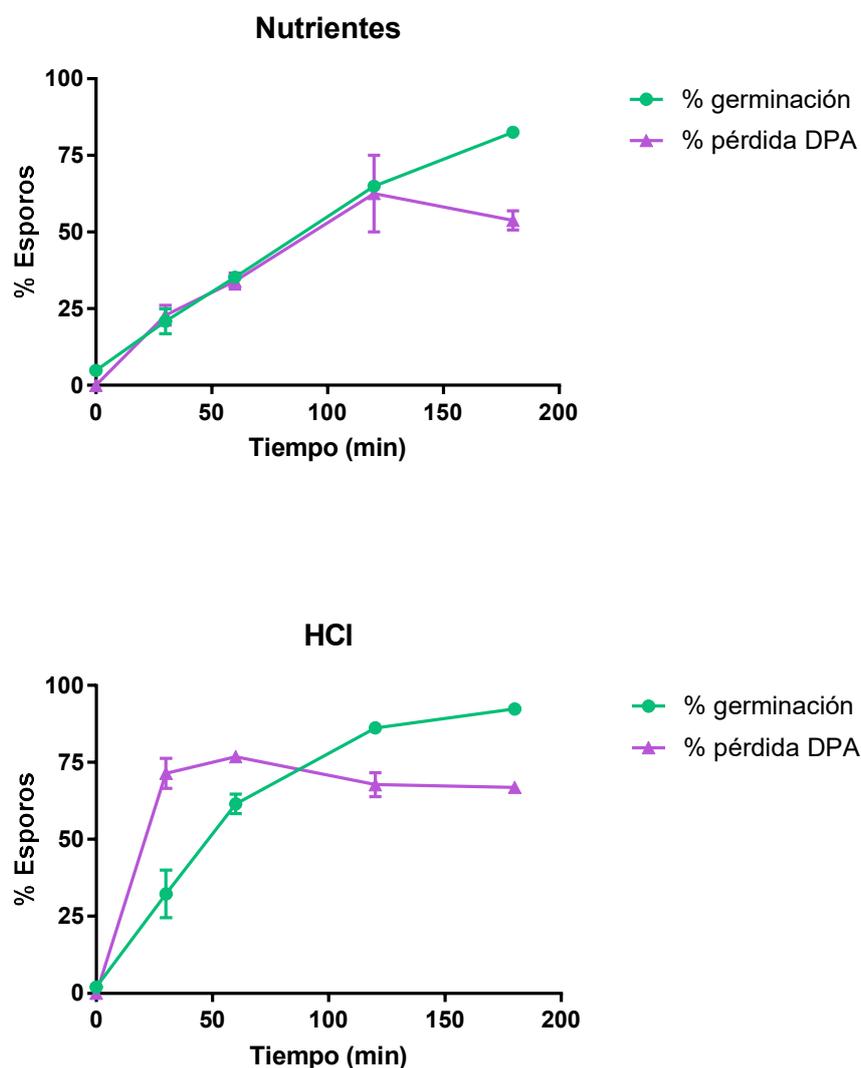


Figura 4.4.23. Evolución de la salida de DPA en relación al porcentaje de germinación durante la exposición a nutrientes y acidez (HCl 0,1 N).

Como se puede observar en la Figura 4.4.23, la salida de DPA estaba muy relacionada con la pérdida de termorresistencia en los esporos expuestos a la germinación

por nutrientes, existiendo una muy buena correlación hasta el 60% de esporos germinados. Por tanto, estos resultados parecen confirmar que son eventos que estarían relacionados. De esta forma, sería la salida de DPA la que permitiese la entrada de agua en el protoplasto y consecuentemente, la pérdida de termorresistencia del espora. Probablemente la determinación de DPA mediante lectura espectrofotométrica a 270 nm, estaría detectando la salida de DPA y de otros compuestos de bajo peso molecular.

Por otro lado, en el caso de la germinación con acidez, se aprecia que la salida de DPA sucede con anterioridad a la germinación. Estos resultados podrían apoyar la teoría de que el pH ácido produciría el colapso del córtex, lo que aumentaría la permeabilidad de la membrana interna y permitiría la salida de los compuestos del protoplasto, entre ellos, del DPA. Sin embargo, a pesar de que estos fenómenos también desencadenarían la entrada de agua en el protoplasto y con ello, la pérdida de termorresistencia del espora, en este caso dicha pérdida de termorresistencia sucedería de forma más lenta que la salida de DPA.

En ambos casos se alcanzaba un máximo de salida de DPA, momento a partir del cual la germinación continuaba produciéndose progresivamente en un porcentaje creciente de esporos, sin necesidad de verificarse una salida adicional de DPA.

4.4.9. Comparación y conclusiones

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que la germinación produce cambios diversos en los esporos, que pueden ser diferentes en función del tratamiento escogido para inducirla.

Tabla 4.4.1. Tabla resumen de los cambios fisiológicos que se producen en *B. subtilis* durante la germinación con distintos agentes. ND: no determinado.

	Nutrientes	CaDPA	HHP	HCl	PEAV	UV
Germinación	SI	SI	SI	SI	NO	NO
Descenso DO	+++	ND	+++	+++	-	-
Salida DPA	+++	ND	++	+++	-	-
Tinción IP	+++	++	+++	+	-	-
Tinción Syto 16	+++	+	++	-	-	-

Con la exposición a los nutrientes se observaron cambios fisiológicos a diversos niveles celulares y además rápidamente, es decir, tras 30 min de exposición ya se observó una elevada pérdida de densidad óptica, salida notable de DPA y pérdida de termorresistencia (germinación). Pero también se observó tinción con IP en un elevado porcentaje de la población, lo que resulta interesante puesto que hasta la fecha tan solo se ha relacionado este fenómeno con la pérdida de viabilidad del espora (Laflamme y col., 2004; Mathys y col., 2007). Por lo tanto, los datos obtenidos en este estudio demuestran que en la fase I de la germinación con nutrientes se produce cierta permeabilización de la membrana interna. Este podría ser un evento posterior a la salida de DPA y a la pérdida de densidad óptica y de termorresistencia, ya que parece que el porcentaje de tinción aumenta más lentamente. Sin embargo, dado que el colorante empleado tiene un peso molecular elevado, no se puede descartar que la permeabilización de la membrana interna sucediese de forma simultánea al resto de eventos, o bien precederlos, e incluso ser la causa de la salida rápida de DPA. Es decir, la permeabilización de la membrana interna podría estar relacionada con el intercambio de moléculas observadas entre el protoplasto del espora y el medio extracelular durante la germinación. También se observó que la hidrólisis del córtex sería un proceso más lento, como cabía esperar, confirmándose que se trata de un evento que tiene lugar en la fase II de la germinación.

Por otro lado, con los tratamientos de Ca-DPA se observaron cambios similares a la germinación con nutrientes, incluida la tinción con IP. Sin embargo, en este caso, parece que la tinción se perdía progresivamente tras tiempos prolongados de tratamiento, lo que podría deberse a cambios en el ADN que impedirían la unión del colorante, ya que es poco probable que la membrana interna recuperase de nuevo su integridad bajo esas condiciones. En este caso se observó una tinción con Syto 16 de menor magnitud a la esperada, lo que podría ser porque o bien el tratamiento no produce la hidrólisis del córtex, o es más lenta, o bien, al igual que podría ocurrir en el caso del IP, por posibles cambios en la conformación del ADN que impidieran su unión. Tampoco se observó gran porcentaje de tinción con Syto 16 en los tratamientos con altas presiones hidrostáticas, por lo que parece que estos tratamientos no afectarían mucho al córtex, o al menos lo harían en menor magnitud que en la germinación por nutrientes. Sin embargo, sí que se observaron los cambios propios de la fase I de la germinación, como la pérdida de densidad óptica y la salida de DPA. Por otro lado, también en este caso se observó tinción con IP, lo que sugiere que esta tecnología también afectaría a la membrana interna de los

esporos. En el caso de las altas presiones, se observó una elevada pérdida de termorresistencia, que podría deberse a la entrada de los esporos en la fase I de la germinación y/o a cambios adicionales causados por esta tecnología, como modificaciones en los enlaces hidrofóbicos como han descrito algunos autores (Okazaki y col., 2000).

Por último, con los tratamientos de acidez se observó que la fase I se alcanzaba rápidamente en un elevado porcentaje de esporos, con salida rápida de DPA, pero apenas se observó tinción con ninguno de los dos colorantes. Esto podría ser debido a que, como se ha argumentado en el caso del Ca-DPA, el tratamiento produjese cambios en el ADN de los esporos, impidiendo la unión con los colorantes. No obstante no se puede descartar la ausencia de cambios celulares notables, y serían necesarios más estudios para confirmar este aspecto.

En resumen, con todos los tratamientos empleados, salvo con los pulsos eléctricos de alto voltaje y con la radiación ultravioleta, se consiguió inducir la germinación de *B. subtilis*. En todos los casos se observó que la entrada en fase I de germinación fue relativamente rápida en un elevado porcentaje de esporos, mientras que la fase II, atendiendo a la tinción con Syto 16, se trata de un evento más tardío. Por otro lado, la permeabilización de la membrana interna parece estar relacionada con la salida de DPA y entrada de agua al protoplasto, es decir, podría estar relacionada de alguna manera con la germinación de los esporos y con su pérdida de termorresistencia. Esta permeabilización se detectó en mayor o menor grado en todos los casos excepto en la germinación inducida por acidez, y fue especialmente relevante en el caso de la germinación inducida por nutrientes (Figura 4.4.24).

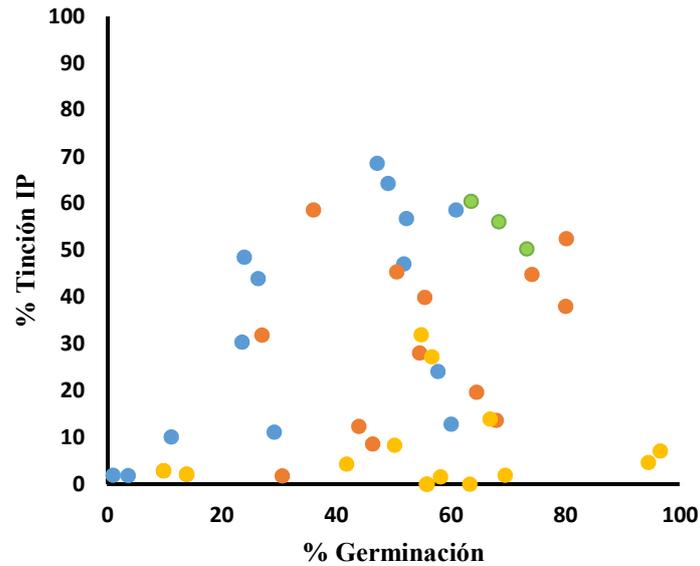
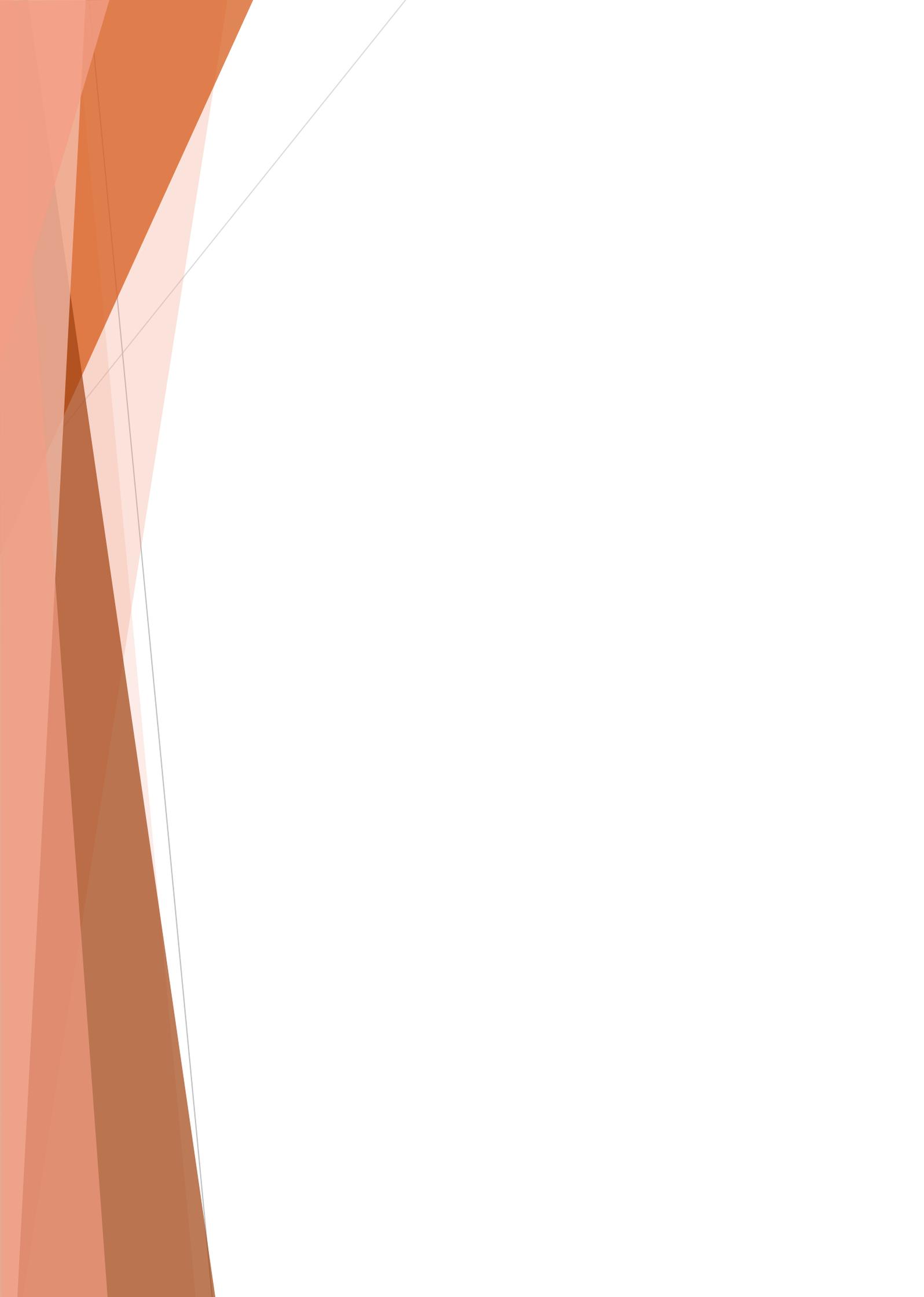


Figura 4.4.24. Relación entre los porcentajes de germinación y de tinción con IP en la germinación inducida por nutrientes (●), Ca-DPA (●), altas presiones hidrostáticas (●) y HCl (●).

Además, a pesar de que en un inicio se asume que la pérdida de termorresistencia sucede al final de la fase II de la germinación, los datos obtenidos sugieren que se podría producir en la fase I, con la hidratación parcial del protoplasto. Algunos autores han comentado que en esta fase se produce cierta pérdida de termorresistencia, aunque no ha sido posible encontrar datos en la bibliografía sobre cuánta termorresistencia se pierde o en qué momento sucede. Como este aspecto, en nuestra opinión, necesitaba de un estudio más detallado, decidimos estudiarlo en mayor profundidad.

4.5. Estudio de la pérdida de resistencia al calor, a los PEAV y a la radiación UV de esporos parcialmente germinados



De forma tradicional se ha aceptado que los esporos pierden su extrema resistencia a distintos agentes, tanto físicos como químicos, cuando germinan (Kohler y col., 2018; Setlow y Johnson, 2019). Es por ello, que una estrategia para la inactivación de esporos mediante tratamientos menos intensos consiste en inducir su germinación, para posteriormente inactivar los esporos germinados. Este planteamiento ha desencadenado un gran esfuerzo en la investigación de distintos mecanismos para inducir de forma homogénea la germinación de los esporos. Sin embargo, no se ha prestado apenas atención a la resistencia que poseen los esporos germinados a los distintos tratamientos. Por ejemplo, no está claro el momento concreto de la germinación en la que se pierde dicha resistencia, ni si se trata de un proceso de todo o nada o si, por el contrario, la resistencia se va perdiendo paulatinamente.

Se ha descrito que la salida de DPA en la fase I de la germinación permite la entrada de algo de agua al protoplasto, lo que conlleva cierta pérdida de termorresistencia (Setlow y col., 2001; Setlow, 2003), que se completaría con la hidrólisis del córtex en la fase II y la hidratación total del protoplasto. Por otro lado, Luu y Setlow (2014) observaron que los esporos en la etapa de compromiso (“commitment”) eran sensibles a temperaturas no letales para los esporos latentes, debido posiblemente, según los autores, a que a esas temperaturas se produce la salida de DPA en los esporos comprometidos. En definitiva, a pesar de que se ha planteado la inducción de la germinación y la posterior inactivación de los esporos germinados, como una estrategia para optimizar su inactivación, apenas se ha estudiado cómo ni en qué momento ocurre dicha pérdida de resistencia. Tampoco se ha estudiado si los esporos pierden la resistencia a todos los agentes al mismo tiempo o, por el contrario, cada tecnología/agente los inactivaría en distintas etapas de la germinación. Además, tampoco se conoce con certeza si la resistencia de los esporos parcialmente germinados es similar a la de las células vegetativas o intermedia entre la de estas y los esporos latentes.

Por otro lado, los pulsos eléctricos de alto voltaje se han mostrado como una tecnología eficaz en la inactivación de células vegetativas a bajas temperaturas, que afecta en menor medida a las propiedades de los alimentos, por lo que se han propuesto como una alternativa frente a los tratamientos térmicos. No obstante, pese a que algunos autores han observado inactivación de esporos con esta tecnología (Marquez y col., 1997), en la mayoría de ocasiones se ha descrito que tan solo en combinación con calor resultaría efectiva (Reineke y col., 2015; Siemer y col., 2014). Se ha propuesto que las proteínas de

la cubierta, así como del córtex y el protoplasto podrían ser las dianas celulares de esta tecnología en los esporos (Pillet y col., 2016). Se ha descrito también que la resistencia de los esporos frente a los pulsos eléctricos de alto voltaje se perdería con la germinación del espora (Hamilton y Sale, 1967). La baja efectividad de los pulsos eléctricos de alto voltaje en la inactivación de esporos podría deberse a que la diana celular de esta tecnología en células vegetativas es la membrana citoplasmática (Mañas y Pagán, 2005), que es equivalente a la membrana interna de los esporos. En el caso de los esporos, esta envoltura tiene un diámetro entre 4 y 12 veces menor que en células vegetativas, es decir, está más comprimida que en las células vegetativas, por lo que se requeriría una fuerza de campo eléctrico muy elevada para poder producir su permeabilización (Reineke y Mathys, 2020). Sin embargo, cuando los esporos germinan, el diámetro de esta membrana aumenta (Cowan y col., 2003), por lo que resultaría más sencilla su permeabilización.

En cuanto a la radiación ultravioleta, se trata de una tecnología muy efectiva en la inactivación tanto de bacterias, como de virus y hongos (Guerrero-Beltrán y Barbosa-Cánovas, 2004). También ha resultado ser efectiva frente a esporos bacterianos, aunque su resistencia es entre 10 y 50 veces superior a la de las células vegetativas (Nicholson y col., 2000; Setlow, 2006; Soni y col., 2016). Aunque el mecanismo de acción de esta tecnología en las células vegetativas se sabe que es el daño al ADN y la interferencia en los sistemas de transcripción y traducción, en los esporos inicialmente se propuso la cubierta como la responsable de su mayor resistencia. Sin embargo, parece que la resistencia de los esporos se debe a las características de su DNA, sobre todo a las proteínas SASPs, que alteran las propiedades fotoquímicas del DNA, de manera que durante el tratamiento con UV se formarían compuestos que no son tan letales como los que se forman en las células vegetativas (Nicholson y col., 2000; Soni y col., 2016). Además, algunos esporos tienen la capacidad de reparar los daños causados por UV (Setlow y Li, 2015). Por otro lado, se ha descrito que el Ca-DPA actúa como fotosensibilizador, facilitando la transferencia de energía del DPA fotoexcitado a los residuos de timina, para promover la formación de fotoproductos de esporos (“spore photoproduct”, SP) (Douki y col., 2005), que son las moléculas letales que se forman con esta tecnología en los esporos (Setlow y Li, 2015). Se ha descrito que durante la germinación, tras la salida de DPA, pero antes de la degradación de las proteínas SASPs, la resistencia a la radiación ultravioleta de los esporos en germinación aumenta con respecto a los esporos latentes, debido precisamente a la liberación de DPA (Setlow,

2001; Setlow y Li, 2015). Por lo tanto, con esta tecnología podría ocurrir lo contrario de lo que ocurre con otras tecnologías y es que, durante la germinación, los esporos podrían ser más resistentes.

En resumen, hay muchas cuestiones sin resolver en cuanto a la pérdida de resistencia de los esporos durante la germinación, por lo que este capítulo se centró en estudiar la resistencia de esporos tras distintos tiempos de exposición a varios germinantes incluidos en el capítulo anterior (acidez, nutrientes y Ca-DPA) frente al calor, por ser la tecnología de referencia en la inactivación de esporos, los pulsos eléctricos de alto voltaje, ya que es una tecnología emergente poco efectiva en la inactivación de esporos, y frente a la radiación UV, de eficacia intermedia. Se dedicó un mayor esfuerzo a caracterizar la sensibilización frente al calor por ser esta tecnología la más importante desde un punto de vista práctico.

El modo de acción de las tres tecnologías es muy diferente, lo cual podría aportar conocimiento básico acerca de la fisiología de los esporos germinados, y su transición hacia célula vegetativa. Aunque resulta difícil poder hacer comparaciones debido a la muy diferente naturaleza de los tratamientos estudiados, se escogieron condiciones (intensidad de tratamiento) que conseguían una inactivación al menos dos ciclos logarítmicos superior en las células vegetativas de *B. subtilis* en relación a los esporos.

4.5.1. Estudio de la termorresistencia de esporos de *B. subtilis* parcialmente germinado

La pérdida de termorresistencia es un parámetro importante, no solo desde un punto de vista práctico, sino que también se trata de una de las técnicas empleadas para estudiar la germinación. Es decir, se considera que un espora ha germinado cuando se inactiva con un tratamiento de pasterización. No obstante, tal y como se discutió en el capítulo anterior, no se sabe con certeza en qué etapa de la germinación se encuentra dicho espora. Además, tampoco sabemos si la termorresistencia es similar a la que muestran las células vegetativas o es intermedia entre estas y la de los esporos latentes. Por ello, en este capítulo se utilizaron esporos de *B. subtilis* a los que se expuso a tres tratamientos germinantes: ácido clorhídrico, caldo nutritivo con extracto de levadura (CNYE) y Ca-DPA. A lo largo del tiempo de exposición a los germinantes se realizaron determinaciones de supervivencia a 95 °C. Se escogió esta temperatura tras experimentos

preliminares, ya que permitía observar la evolución del fenómeno de termosensibilización con tiempos de exposición al calor razonables.

En primer lugar, se estudió la termorresistencia de las células vegetativas de *B. subtilis* para poder comparar después con los esporos germinados (Figura 4.5.1).

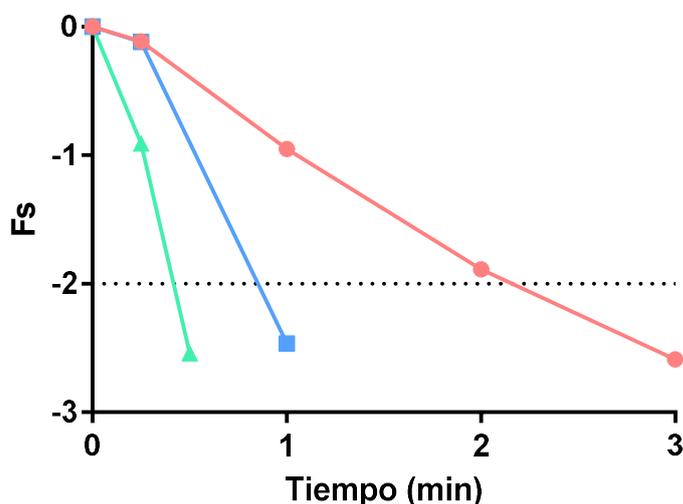


Figura 4.5.1. Curvas de supervivencia de las células vegetativas de *B. subtilis* a 50°C (●), 55°C (■) y 60°C (▲). La línea discontinua representa el nivel de recuento fiable de la técnica utilizada.

Como muestra la Figura 4.5.1, las células vegetativas fueron muy sensibles al calor, llegando a inactivarse casi dos ciclos logarítmicos tras dos minutos a 50 °C (valor D_{50} de 1,11 minutos). Seguidamente se procedió a evaluar la termorresistencia a 95°C de los esporos de *B. subtilis* sometidos a tratamientos de germinación durante diferentes tiempos. A esta temperatura, dada la termosensibilidad de las células vegetativas, éstas deberían inactivarse en gran magnitud ($\geq 12D$) de manera prácticamente instantánea. Tras cada tiempo seleccionado de exposición a los tres agentes germinantes, se evaluó la termorresistencia a 95 °C. La Figura 4.5.2 muestra a modo de ejemplo las curvas de supervivencia de los esporos nativos y de los parcialmente germinados tras la exposición durante 120 minutos a HCl.

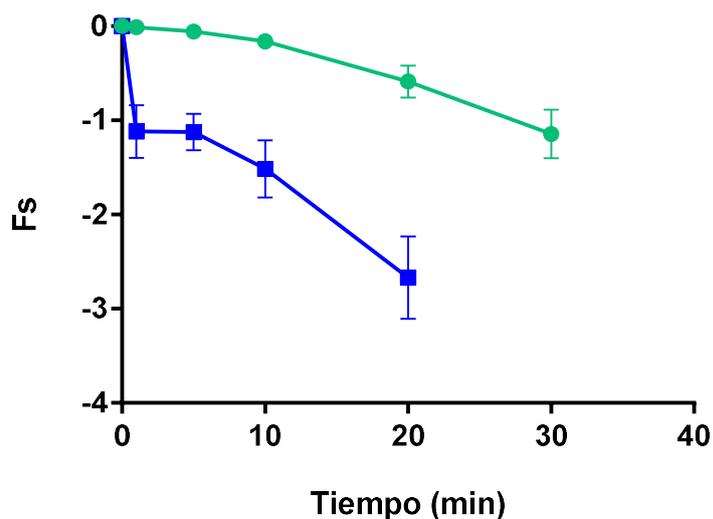


Figura 4.5.2. Curvas de supervivencia a 95 °C de esporos nativos (●) y de esporos parcialmente germinados tras 120 minutos de exposición a HCl (■).

El ejemplo de la figura muestra cómo los esporos parcialmente germinados perdían resistencia al calor, observándose una pérdida de viabilidad inicial muy acusada, que se manifestaba en el primer recuento obtenido tras 1 minuto a 95°C. Posteriormente, en este caso, el resto de la población superviviente se inactivaba frente al calor más rápidamente que la población nativa.

La Figura 4.5.3 muestra todas las gráficas de supervivencia correspondientes a los esporos germinados en presencia de nutrientes, la Figura 4.5.4 a los germinados con Ca-DPA, y la Figura 4.5.5, a los germinados por la acción del HCl. En cada caso se muestra una sola réplica individual representativa, correspondiente a una única curva de germinación, para una mejor observación del comportamiento.

Como se puede observar en las figuras, quizá uno de los aspectos más destacables sea la rápida inactivación inicial que se producía, que parecía más relevante en el caso de los esporos expuestos a nutrientes. Con objeto de profundizar en este aspecto, se representaron las Figuras 4.5.6, 4.5.7 y 4.5.8 en la que se relacionan los ciclos logarítmicos de inactivación alcanzados tras un minuto de exposición al tratamiento térmico a 95°C, y los ciclos logarítmicos de germinación en ese mismo punto, mediante la exposición a cada uno de los tres agentes germinantes. Como se desprende de la Figura,

parecía existir una correlación entre la germinación y la inactivación inicial, especialmente patente en el caso de los esporos germinados por exposición a nutrientes.

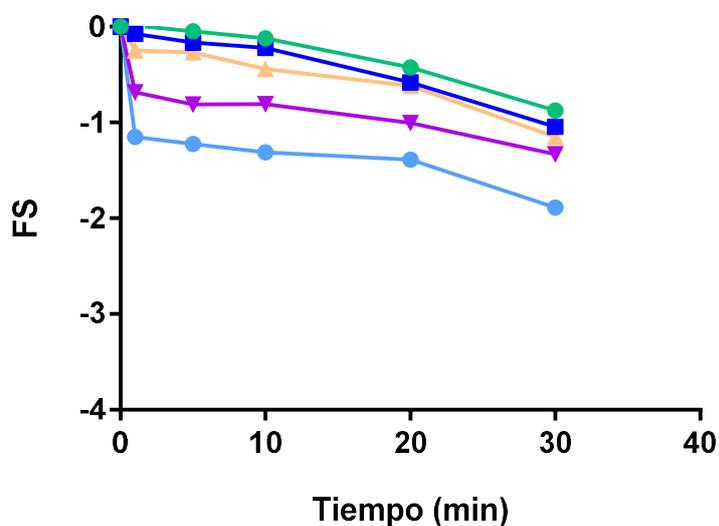


Figura 4.5.3. Curvas de supervivencia a 95 °C de esporos de *B. subtilis* tras distintos tiempos de exposición a nutrientes: 0 minutos (●), 1 minuto (■), 10 minutos (▲), 60 minutos (▼) y 120 minutos (●).

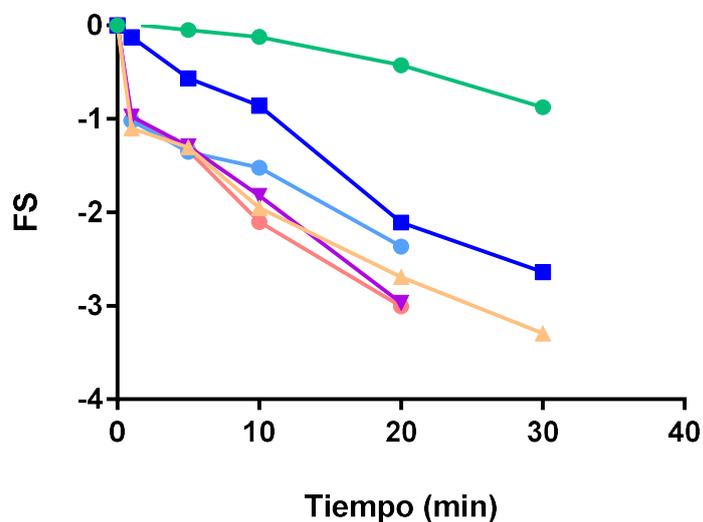


Figura 4.5.4. Curvas de supervivencia a 95 °C de esporos de *B. subtilis* tras distintos tiempos de exposición a Ca-DPA: 0 minutos (●), 1 minuto (■), 10 minutos (▲), 60 minutos (▼), 120 minutos (●) y 240 minutos (●).

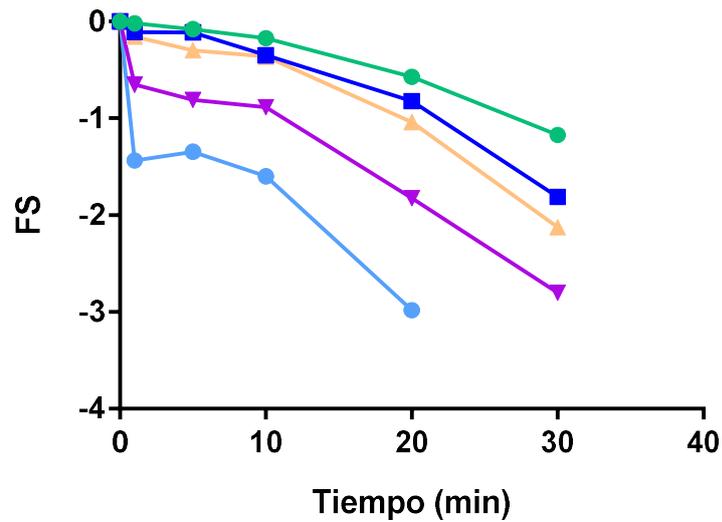


Figura 4.5.5. Curvas de supervivencia a 95 °C de esporos de *B. subtilis* tras distintos tiempos de exposición a HCl: 0 minutos (●), 1 minuto (■), 10 minutos (▲), 60 minutos (▼) y 120 minutos (●).

La Figura 4.5.9 incluye todas las réplicas individuales, para un análisis más detallado de los datos experimentales.

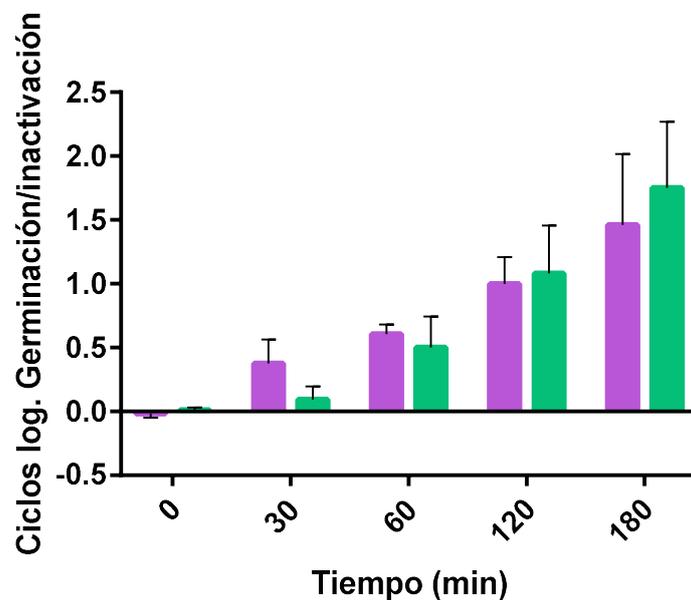


Figura 4.5.6. Relación entre los ciclos log. de germinación (barras moradas) y de inactivación (barras verdes) tras 1 minuto a 95 °C en esporos de *B. subtilis* tras distintos tiempos de exposición a nutrientes.

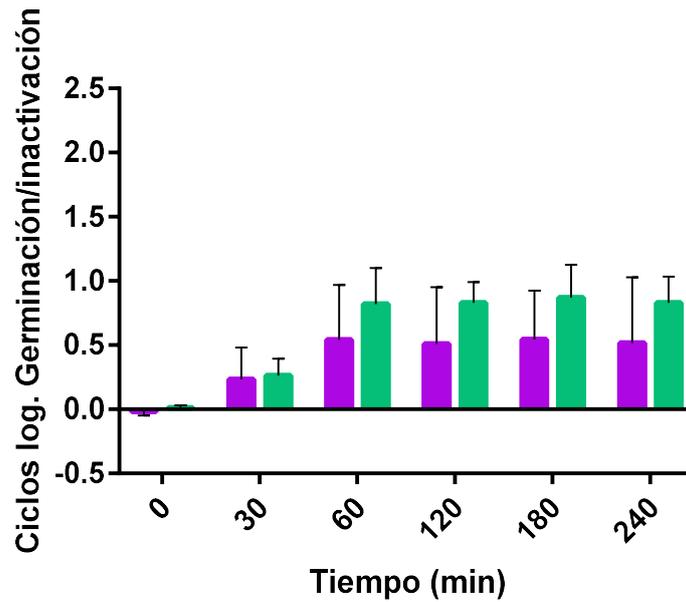


Figura 4.5.7. Relación entre los ciclos log. de germinación (barras moradas) y de inactivación (barras verdes) tras 1 minuto a 95 °C en esporos de *B. subtilis* tras distintos tiempos de exposición a Ca-DPA.

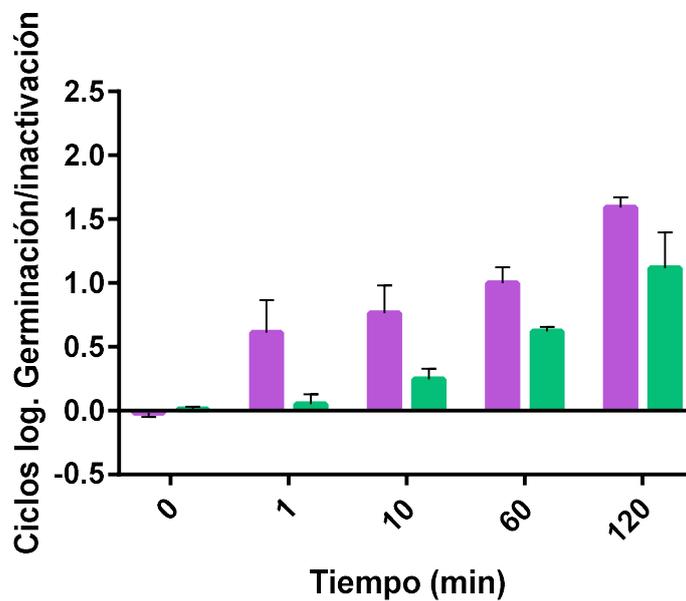


Figura 4.5.8. Relación entre los ciclos log. de germinación (barras moradas) y de inactivación (barras verdes) tras 1 minuto a 95 °C en esporos de *B. subtilis* tras distintos tiempos de exposición a HCl.

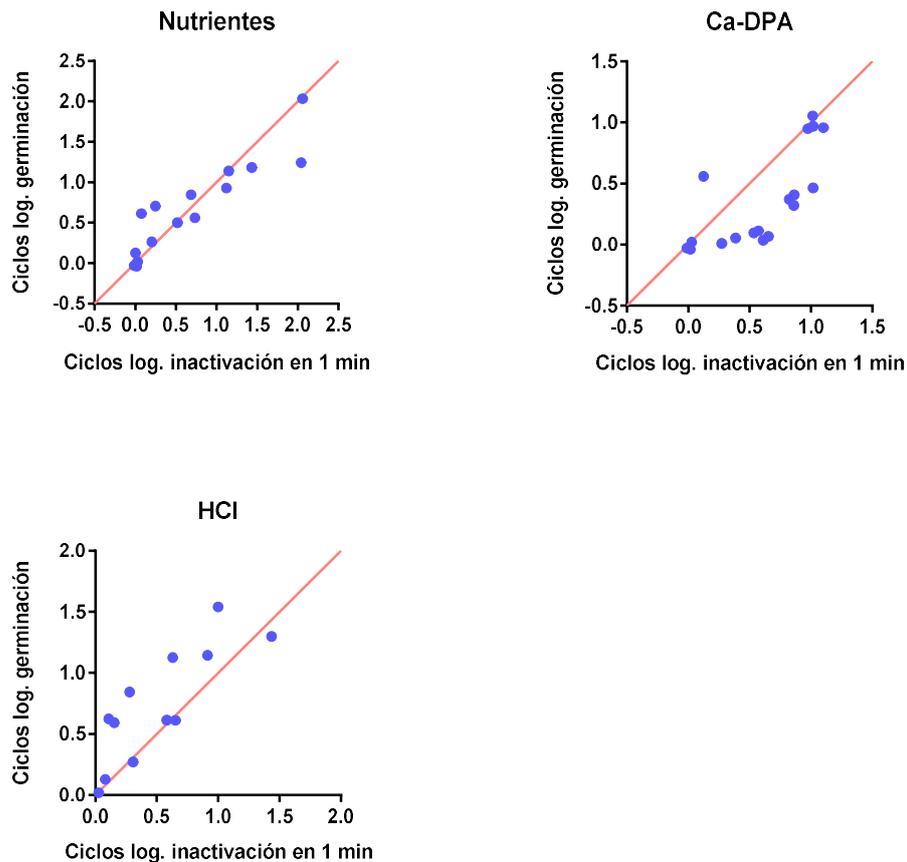


Figura 4.5.9. Relación entre los ciclos log de germinación y los ciclos log de inactivación tras 1 minuto a 95 °C con los tres germinantes.

De la Figura 4.5.9 se desprende que en la germinación con nutrientes había mayor correlación entre la pérdida de termorresistencia inicial (tras un minuto de tratamiento a 95 °C) y la germinación, siendo su coeficiente de determinación (R^2) 0,83 frente a 0,65 en el caso del HCl y 0,53 en el del Ca-DPA. Además, la pendiente de la recta de correlación se aproximaba más al valor de 1 en el caso de la germinación por nutrientes (0,85) y en la germinación por HCl (1,2), que en el caso de la germinación por exposición al Ca-DPA (0,63). Es importante tener presente que consideramos como germinados aquellos esporos que se inactivaban con un tratamiento de diez minutos a 75 °C, que es una combinación de tiempo/temperatura muy superior a la necesaria para inactivar varios ciclos de las células vegetativas (Figura 4.5.1). En el caso de la germinación con Ca-DPA, también parecía existir cierta correlación entre la germinación y la inactivación inicial, si bien la mayor variabilidad encontrada disminuyó la significación estadística, y con ello dificultaba la interpretación de los resultados.

Estos resultados indican que los esporos parcialmente germinados a través de agentes diferentes presentan características de resistencia distintas. Por ejemplo, a pesar de que tras 120 minutos de exposición a HCl y 180 min de exposición a CNYE el nivel de germinación era similar, de alrededor de 1,5 ciclos log, el nivel de inactivación tras un minuto de tratamiento térmico fue diferente, 1,1 ciclos log con HCl y 1,75 ciclos log con CNYE. Es decir, parecía que los esporos germinados con nutrientes perdían la resistencia al calor antes que los germinados con HCl. Esto podría deberse a que, como se discutió en el capítulo anterior, en la germinación con nutrientes se producen numerosos cambios celulares, y se ven claramente influidas varias estructuras, como es el caso del córtex. En la germinación con nutrientes se había observado tinción con Syto 16, mientras que apenas había tinción en la germinación con HCl, lo que indicaba que se producía la hidrólisis del córtex en la germinación inducida por los nutrientes. Este fenómeno podría justificar la rápida pérdida de termorresistencia, ya que el córtex es una de las envolturas que se ha relacionado con la resistencia al calor (Atrih y Foster, 1999; Popham y col., 1996). Se ha observado que, si el espora acumula menos peptidoglicano en el córtex durante la esporulación, acumula más agua en el protoplasto y, por tanto, es más termosensible (Imae y Strominger, 1976; Popham y Bernhards, 2015).

Por otro lado, parece que en la germinación con HCl, la germinación precedía a la inactivación térmica a 95°C (Figura 4.5.6, Figura 4.5.9), al contrario de lo que ocurría en la germinación con nutrientes. Dicho de otra manera, la adquisición de termosensibilidad en los esporos germinados por acidez se producía más gradualmente que en el caso de los esporos germinados por nutrientes. Quizá este fenómeno podría deberse a que, como se comentó en el capítulo anterior, apenas se observaba permeabilización de la membrana interna, evaluada mediante tinción con IP, en la germinación inducida por HCl. Por tanto, la permeabilización intensa de la membrana interna podría estar involucrada en la rápida pérdida de resistencia térmica. Esta observación está en concordancia con los datos publicados en la bibliografía. Cortezzo y col. (2004) observaron que los esporos con la membrana interna permeabilizada (mediante la aplicación de agentes oxidantes) eran más sensibles frente a tratamientos térmicos a temperaturas moderadas (84 °C). También Rao y col. (2020) describieron que al tratar esporos de *B. subtilis* con CO₂ a elevadas presiones se producía cierta permeabilización de la membrana interna, lo que resultaba en una menor termorresistencia. Además, Griffiths y Setlow (2009) observaron que al modificar la

composición lipídica de la membrana interna, mediante el uso de mutantes en genes relacionados con la biosíntesis de ácidos grasos, se producían cambios en la termorresistencia, lo que sugiere que el estado físico de esta envoltura está relacionado con la resistencia térmica de los esporos.

Por otro lado, se calcularon los valores D de los esporos parcialmente germinados, en la porción lineal de las curvas de supervivencia. Los resultados se muestran en la Tabla 4.5.1.

Tabla 4.5.1. Valores D a 95 °C de esporos de *B. subtilis* parcialmente germinados con nutrientes, Ca-DPA y HCl.

Germinante	Tiempo (min)	Valor D (min)	R^2
<i>HCl</i>	0	26,023 ± 6,258	0,962
	1	19,373 ± 3,695	0,954
	10	14,650 ± 1,910	0,920
	60	12,670 ± 1,455	0,969
	120	11,753 ± 1,580	0,936
<i>CNYE</i>	0	26,023 ± 6,258	0,962
	30	25,540 ± 3,875	0,990
	60	28,223 ± 5,660	0,946
	120	25,743 ± 19,180	0,958
	180	35,150 ± 10,136	0,952
<i>Ca-DPA</i>	0	26,023 ± 6,258	0,962
	30	9,080 ± 2,539	0,911
	60	9,403 ± 2,989	0,980
	120	12,063 ± 4,213	0,957
	180	12,677 ± 3,017	0,995
	240	9,190 ± 1,508	0,991

De los datos de la Tabla 4.5.1 se desprende que los valores D se reducían con el tiempo de exposición al ácido clorhídrico ($p < 0,05$), mientras que cuando la germinación se inducía con nutrientes, los valores D permanecía más o menos constantes, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Para facilitar la interpretación de los resultados se muestran las Figuras 4.5.10, 4.5.11 y 4.5.12.

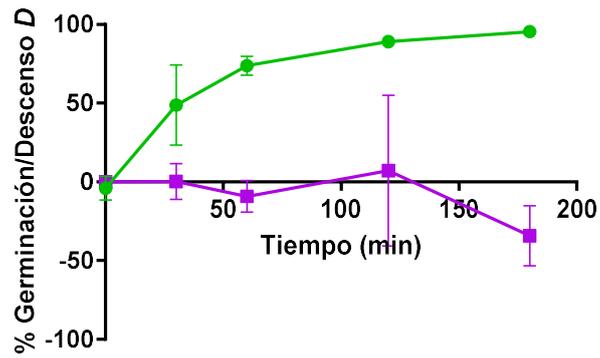


Figura 4.5.10. Relación entre el porcentaje de germinación (●) y el porcentaje de reducción del valor D (■) a cada tiempo de exposición de esporos de *B. subtilis* a nutrientes.

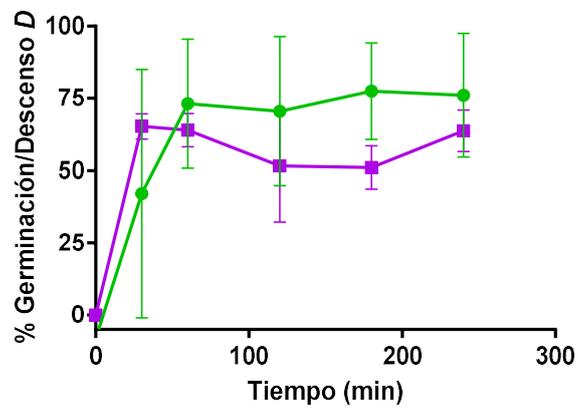


Figura 4.5.11. Relación entre el porcentaje de germinación (●) y el porcentaje de reducción del valor D (■) a cada tiempo de exposición de esporos de *B. subtilis* a Ca-DPA.

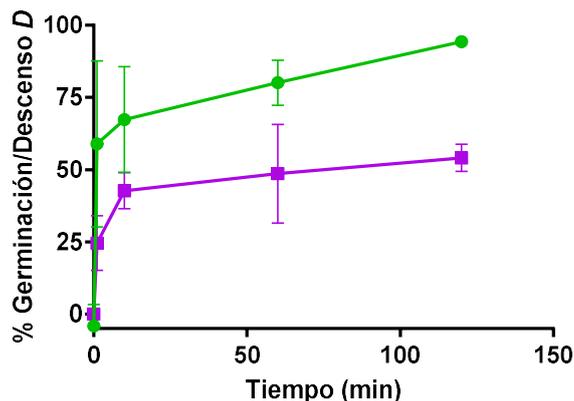


Figura 4.5.12. Relación entre el porcentaje de germinación (●) y el porcentaje de reducción del valor D (■) a cada tiempo de exposición de esporos de *B. subtilis* a HCl.

Como se puede observar en las Figuras 4.5.11 y 4.5.12, en la germinación inducida por Ca-DPA y HCl, parece que había cierta relación entre los porcentajes de germinación y de reducción del valor D a 95 °C. Teniendo en cuenta que el valor D es el tiempo en minutos necesario, a una determinada temperatura, para inactivar el 90% de la población, los resultados obtenidos sugerían que, con el tiempo de exposición a estos dos agentes, la termorresistencia de los esporos se iba reduciendo de forma simultánea a la germinación. Sin embargo, en el caso de la germinación inducida por nutrientes (Figura 4.5.10), los valores D se mantuvieron más o menos constantes, independientemente del tiempo de exposición a los mismos.

Una posible explicación para este fenómeno podría ser que los nutrientes desencadenaran una respuesta global en el espora, que produjera cambios en varias estructuras, como el córtex y la membrana interna, que redujera de forma rápida su termorresistencia, mientras que no lograría afectar a los esporos latentes que quedarán sin germinar. Así, podríamos considerar la pérdida de termorresistencia como un fenómeno de todo o nada en el caso de la germinación por nutrientes, de manera que aquel espora que inicia el proceso de germinación se inactivaría de manera prácticamente instantánea, mientras que los esporos no germinados conservarían su termorresistencia íntegramente, lo cual concuerda con los resultados expuestos en las Figuras 4.5.6 y 4.5.9.

De forma contraria, los tratamientos con HCl y Ca-DPA actuarían más gradualmente sobre los esporos, por lo que se generarían esporos con una distribución de resistencia al calor, que iría modificándose con el tiempo de exposición al germinante.

Por último, para facilitar la comparación con las tecnologías de PEAV y UV que se mostrarán a continuación, se muestran a modo de resumen las Figuras 4.5.13, 4.5.14 y 4.5.15 en las cuales se representa la fracción de supervivientes a un tratamiento térmico de 5 minutos a 95°C de los esporos sometidos a los distintos tratamientos germinantes.

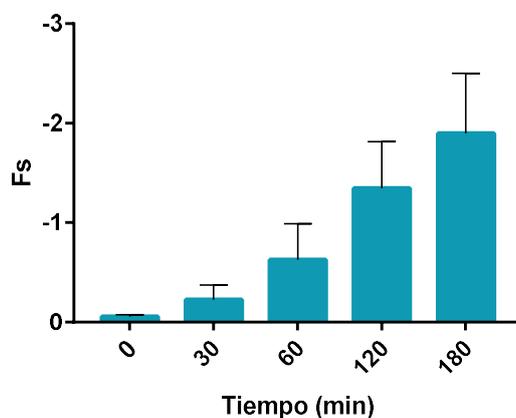


Figura 4.5.13. Fracción de supervivientes tras 5 minutos a 95°C de esporos de *B. subtilis* expuestos a distintos tiempos de germinación con nutrientes.

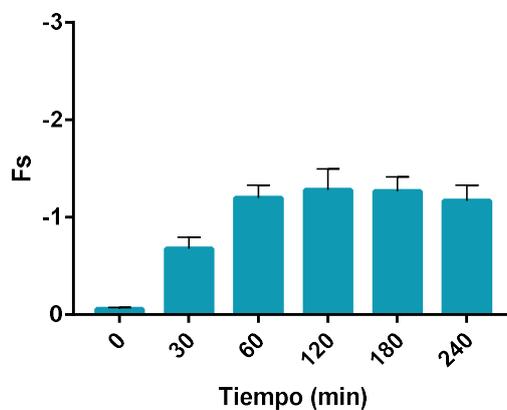


Figura 4.5.14. Fracción de supervivientes tras 5 minutos a 95°C de esporos de *B. subtilis* expuestos a distintos tiempos de germinación con Ca-DPA.

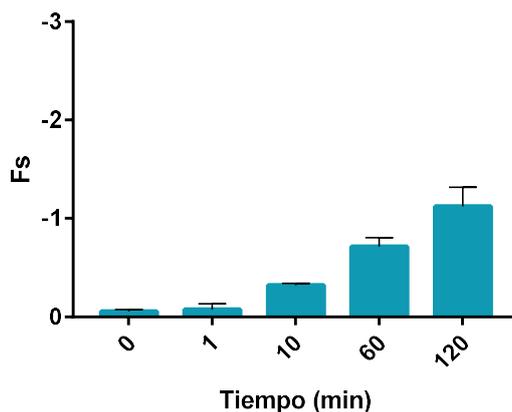


Figura 4.5.15. Fracción de supervivientes tras 5 minutos a 95°C de esporos de *B. subtilis* expuestos a distintos tiempos de germinación con HCl.

4.5.2. Estudio de la resistencia a los pulsos eléctricos de alto voltaje de esporos de *B. subtilis* parcialmente germinado

La búsqueda de tratamientos de conservación de alimentos, alternativos a los tratamientos térmicos, que, al contrario de lo que ocurre en estos últimos, no altere las propiedades organolépticas, ha llevado al estudio de tecnologías emergentes como es el caso de los pulsos eléctricos de alto voltaje. Como ya se vio en el capítulo anterior, esta tecnología en las condiciones que resultan letales para las células vegetativas, mostrarían poca o nula eficacia en la inactivación de esporos bacterianos (Barsotti y Cheftel, 1999). Sin embargo, podrían tener efectos letales en los esporos una vez germinados.

Hamilton y Sale (1967) observaron que los esporos se sensibilizaban frente a esta tecnología al final de la germinación, cuando empezaban a aparecer las células vegetativas. Knorr y col. (1994) también sugirieron que, si bien esta tecnología no resultaba útil en la inactivación de esporos, sí que podía serlo tras un tratamiento previo que lograra germinarlos. Pol y col. (2001) observaron que, tras 50 minutos de exposición a nutrientes, los esporos de *B. cereus* empezaban a perder la resistencia a los PEAV, aunque describieron que no todos los esporos germinados se inactivaban después con el tratamiento de PEAV. Una posible explicación de la tardía pérdida de resistencia en esporos germinados podría ser que dicha resistencia sería dependiente de la degradación de la cubierta del espora (Pol y col., 2001), ya que se ha descrito que esta envoltura podría conferir resistencia a los PEAV (Pillet y col., 2016).

En este estudio, en primer lugar se evaluó la resistencia a los pulsos eléctricos de alto voltaje de las células vegetativas de *B. subtilis*, para poder después compararla con la de los esporos parcialmente germinados. Los resultados se muestran en la Figura 4.5.16. Es importante destacar que se utilizó tampón de pH ácido 4,0, ya que a pH 7,0 no se producía la inactivación de las células vegetativas de *B. subtilis*, bajo las condiciones estudiadas.

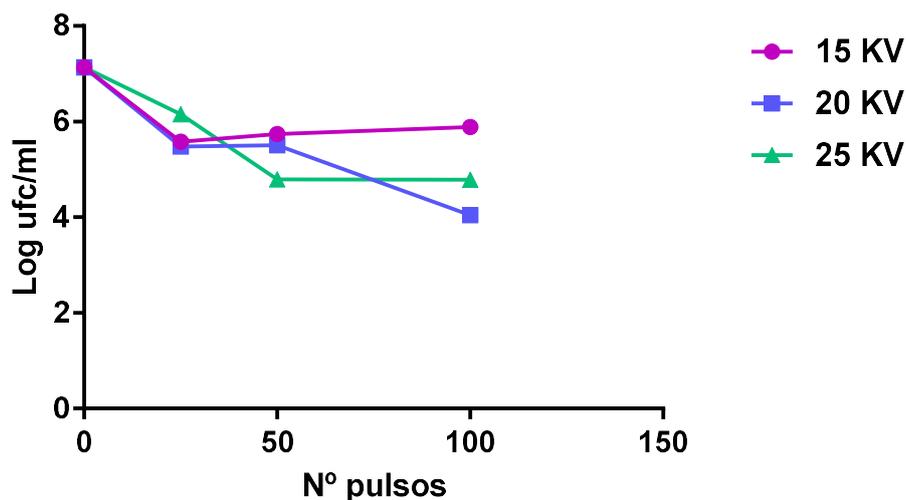


Figura 4.5.16. Curvas de supervivencia de células vegetativas de *B. subtilis* tratados en tampón McIlvaine pH 4 con PEAV a tres intensidades de campo eléctrico: 15 kV, 20 kV y 25 kV.

Con esta tecnología, a las mayores intensidades de campo eléctrico empleadas, 20 y 25 kV, y con el tiempo de tratamiento utilizado, se consiguió inactivar entre el 99,5 y el 99,9 % de las células vegetativas.

Para el estudio de la resistencia frente a esta tecnología de los esporos de *B. subtilis* parcialmente germinado, se emplearon los tres germinantes utilizados en el apartado anterior: nutrientes, Ca-DPA y acidez. A lo largo del tratamiento de germinación, se extrajeron muestras que fueron sometidas a un tratamiento PEAV (20 kV, 100 pulsos, pH 4,0) (Figura 4.5.17).

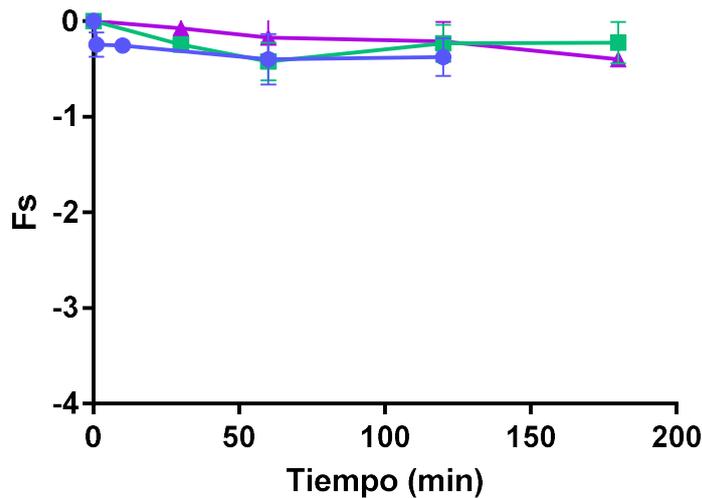


Figura 4.5.17. Curvas de supervivencia de esporos expuestos durante varios tiempos a: nutrientes (■), Ca-DPA (▲) y HCl (●) y tratados posteriormente con PEAV (20 kV, 100 pulsos).

Los resultados demuestran que no se observó inactivación de los esporos germinados. Estos resultados son contrarios a los observados por Pol y col. (2001), donde parte de los esporos germinados, aunque no todos, se empezaban a inactivar transcurridos 50 minutos de germinación con nutrientes, alcanzando 0,8 ciclos log de inactivación, aunque la inactivación con PEAV no llegaba al nivel de inactivación con calor, por lo que no todos los esporos germinados se inactivaban con esta tecnología. Estos autores emplearon una intensidad de campo eléctrico superior a la empleada en este estudio (27 kV) y la inactivación se observó al mismo tiempo que el recuento control aumentaba, es decir, cuando los esporos germinados ya habían comenzado a multiplicarse. Parece que este fenómeno se ha relacionado con la cubierta y el córtex del espora, es decir, estas envolturas condicionarían la resistencia de los esporos a los PEAV (Pillet y col., 2016).

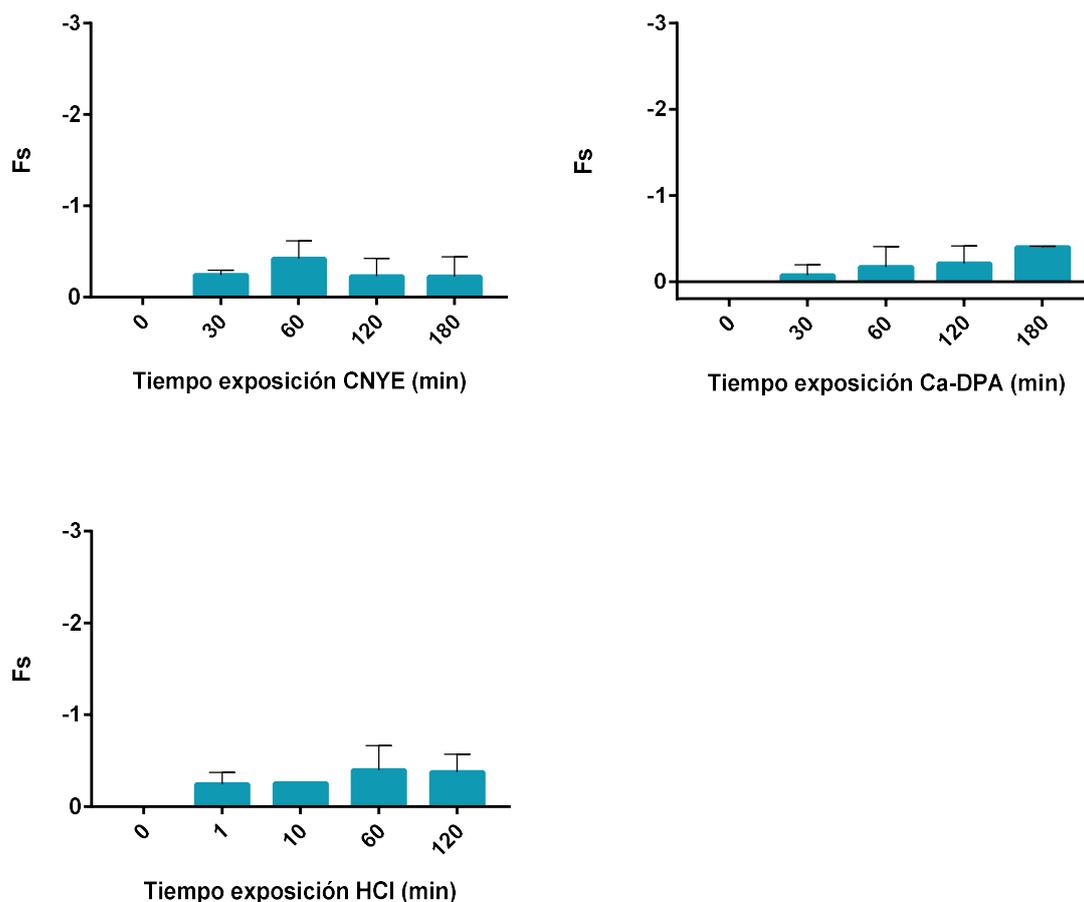


Figura 4.5.18. Evaluación de la resistencia a los PEAV de esporos en distintas fases de la germinación.

Sin embargo, como se comentó en el capítulo anterior, en la germinación con nutrientes se produce la hidrólisis del córtex en un elevado porcentaje de esporos, lo que debería haberlos sensibilizado frente a esta tecnología, pero no fue así. Este resultado sugiere que quizá el córtex no estaría tan involucrado en la resistencia de los esporos a los PEAV o bien, que esta envoltura sea capaz de conferir la resistencia, incluso aunque se encuentre parcialmente hidrolizada. Por otro lado, el hecho de que Pillet y col. (2016) observaran inactivación con PEAV al mismo tiempo en el que los esporos germinados empezaron a multiplicarse, sugiere que quizá esta tecnología podría actuar formando poros en la membrana interna, una vez el espora se ha despojado de las envolturas externas. En estas condiciones el protoplasto se habría hidratado, lo que llevaría a una mayor capacidad de las cargas para moverse libremente a través del él, facilitando la acción de los PEAV.

Sin embargo, en este estudio, los esporos parcialmente germinados con nutrientes y Ca-DPA no fueron más sensibles al tratamiento de pulsos aunque, como se vio en el capítulo anterior, en estas condiciones se produce la permeabilización de la membrana interna en un elevado porcentaje de esporos. Soni y col. (2020) observaron que al tratar los esporos de *B. cereus* con PEAV a 9,4 kV/80 °C se producía una regulación negativa del gen BC2729 que codifica una proteína de unión a penicilina, necesaria tanto para el inicio de la división como para el crecimiento septal en la esporulación, y la regulación positiva de un gen relacionado con la degradación del peptidoglicano, seguido de la permeabilización de las membranas interna y externa, lo que resultaba en una pérdida de termorresistencia en los esporos.

Además, para estudiar si el tratamiento PEAV provocaba la germinación adicional de una fracción de los esporos, se realizaron tratamientos de pasteurización (75 °C/10 min) tras la exposición al germinante y tras el tratamiento con PEAV. Este enfoque podría resultar de interés práctico para diseñar tratamientos germinantes de mayor eficacia. Como se muestra en la Figura 19, esta tecnología no consiguió inducir la germinación de los esporos, ya que los recuentos TP tras el tratamiento germinante + tratamiento de PEAV eran prácticamente coincidentes con los recuentos TP tras el tratamiento germinante solo ($p > 0,05$). Por tanto, se puede concluir que la exposición a los PEAV, además de no inducir la germinación de los esporos nativos, como se vio en el capítulo anterior, tampoco induciría una germinación adicional de aquellos esporos previamente expuestos a un estímulo germinante, como es la acidez, los nutrientes o el CaDPA.

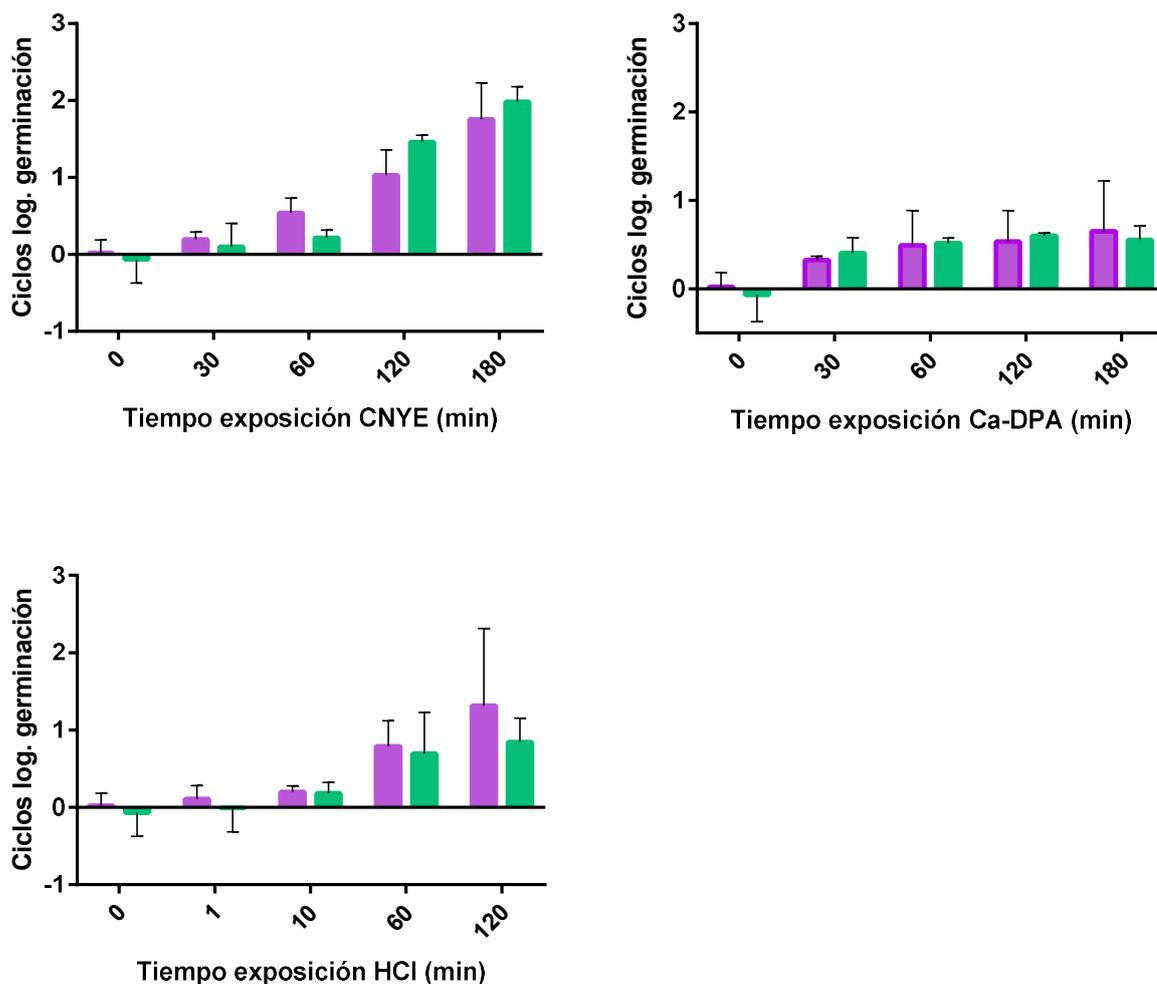


Figura 4.5.19. Ciclos log de germinación de esporos expuestos a distintos tiempos de nutrientes, Ca-DPA y HCl. En morado se muestran los ciclos log antes del tratamiento de PEAV y en verde los ciclos log tras el tratamiento de PEAV.

Cabe recordar que la intensidad de tratamiento empleada en el presente estudio fue menos severa que las empleadas por otros autores, por lo que quizá sea este el motivo por el que se no se observó efecto, y quizás sería interesante emplear mayor intensidad de tratamiento. No obstante, es importante recordar que las condiciones de tratamiento empleadas, sí eran capaces de inactivar más de dos ciclos log de células vegetativas. En cualquier caso, de los resultados obtenidos se puede desprender que los esporos parcialmente germinados continúan siendo resistentes frente a los pulsos eléctricos de alto voltaje y que quizá la pérdida de resistencia frente a los PEAV tenga lugar posteriormente, en la fase de desarrollo del espora germinado.

4.5.3. Estudio de la resistencia a la radiación ultravioleta de esporos de *B. subtilis* parcialmente germinado

En este estudio, en primer lugar, se evaluó la resistencia frente a la radiación ultravioleta de las células vegetativas y de los esporos de *B. subtilis* (Figura 4.5.20). Como se puede ver en la Figura, con los tratamientos empleados (13,62 y 40,48 kJ/cm²), se produjo también cierta inactivación de la población de esporos nativos (1,2 y 1,7 ciclos log, respectivamente). No obstante, las células vegetativas fueron mucho más sensibles a los tratamientos, mostrando una inactivación de 3,7 y 4,3 ciclos log, respectivamente.

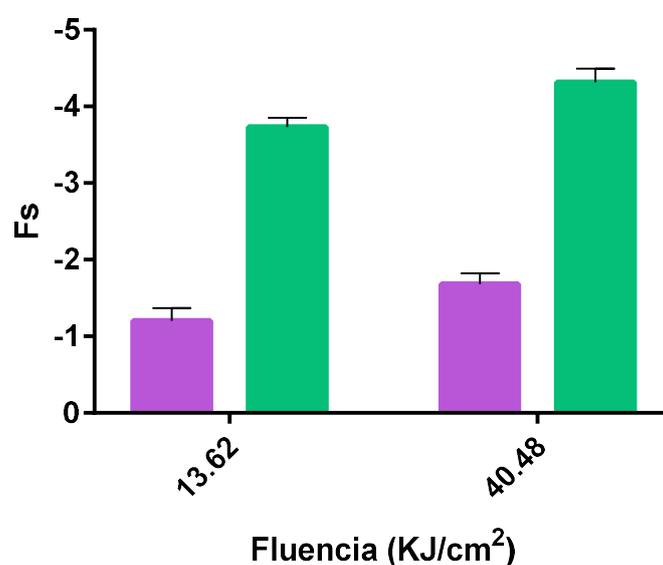


Figura 4.5.20. Evaluación de la resistencia frente a la radiación UV de esporos (barras moradas) y células vegetativas (barras verdes) de *B. subtilis*.

El tiempo de tratamiento seleccionado para tratar posteriormente a los esporos parcialmente germinados fueron 5 segundos (13,62 KJ/cm²), ya que incrementar la intensidad del tratamiento no suponía una mayor diferencia en la resistencia de los esporos nativos y las células vegetativas. Una vez seleccionadas las condiciones de tratamiento, se estudió la resistencia de los esporos expuestos a los tres agentes germinantes, al igual que en el caso del calor y los PEAV (Figura 4.5.21).

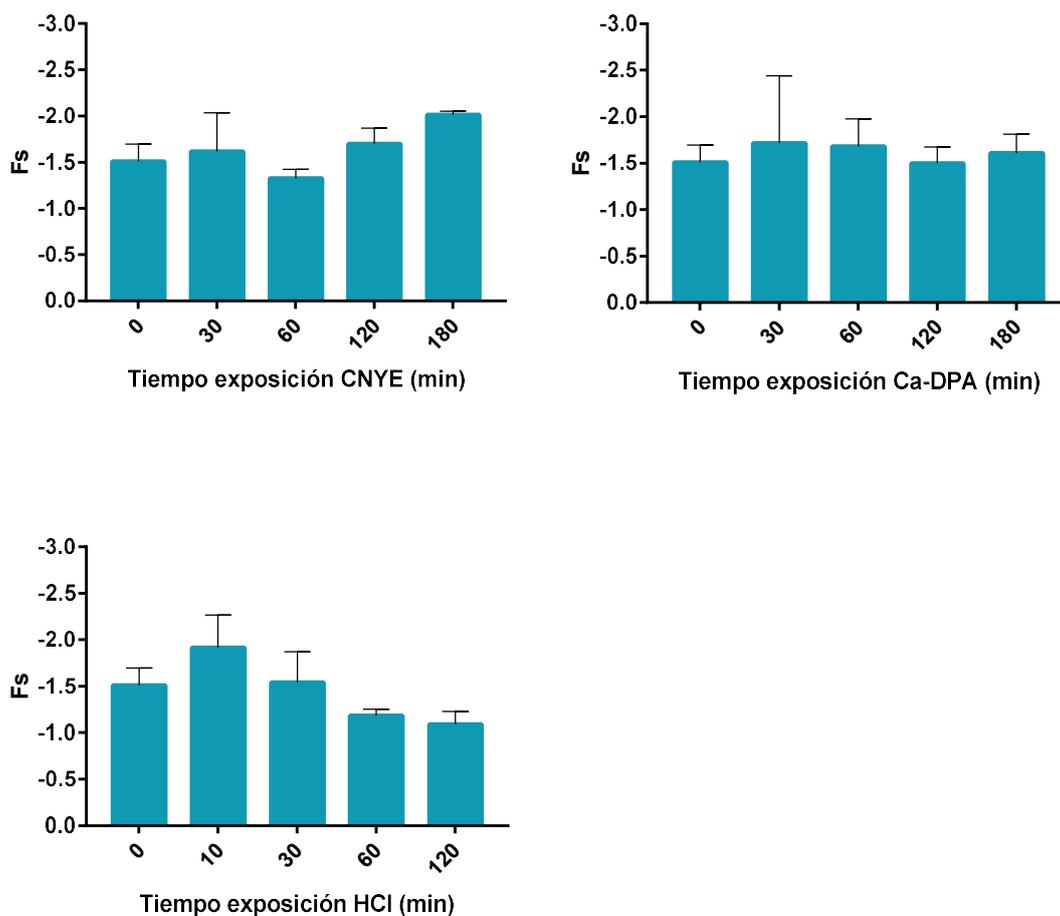


Figura 4.5.21. Evolución de la resistencia frente a la radiación ultravioleta de esporos de *B. subtilis* a distintos tiempos de germinación con nutrientes, Ca-DPA y HCl.

Como se puede observar en la Figura 4.5.21, aunque las diferencias fueron muy sutiles, en el caso de la germinación con HCl, parece que al inicio la resistencia frente a los UV disminuía ligeramente, para después aumentar. Así tras 120 min de exposición al ácido, con el tratamiento de ultravioleta se inactivaba 1,0 ciclo log, mientras que en los esporos nativos la inactivación era de 1,5 ciclos log ($p < 0,05$). Este fenómeno, contrario a lo esperado, podría deberse a la liberación de DPA que ha sido descrito como un fotosensibilizador. Es decir, conforme se va produciendo la germinación, tiene lugar la salida del DPA, por lo que en ese momento y antes de la degradación de las proteínas SASPs, los esporos serían más sensibles a esta tecnología, como han descrito otros autores (Setlow, 2001; Setlow y Li, 2015). Cabe destacar que como se observó en el capítulo 4.4

de esta Tesis Doctoral, el DPA en los tratamientos de acidez se libera de manera previa a la germinación.

Por otro lado, en el caso de la germinación con nutrientes, parece que la resistencia aumentaba ligeramente a los 60 min, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Posteriormente los esporos se sensibilizarían al tratamiento de UV, encontrándose diferencias significativas entre 60 y 180 min ($p < 0,05$), si bien de pequeña magnitud. Este efecto podría deberse a la degradación de las proteínas SASPs (Setlow y Li, 2015). En cuanto a los esporos parcialmente germinados con Ca-DPA, no se observaron diferencias de resistencia frente a la radiación ultravioleta entre los distintos tiempos de germinación ($p > 0,05$).

Como observación general, para los esporos germinados parcialmente por los tres agentes estudiados, se puede concluir que no se observó una sensibilización relevante frente a la radiación UV.

4.5.4.Comparación y conclusiones

En este capítulo se estudió la resistencia frente al calor, pulsos eléctricos de alto voltaje y radiación ultravioleta de esporos parcialmente germinados con tres agentes: nutrientes, Ca-DPA y acidez. En todos los casos los esporos latentes fueron notablemente más resistentes que las células vegetativas, como cabía esperar. Sin embargo, se observaron distintos comportamientos en los esporos parcialmente germinados en función del tratamiento de inactivación empleado.

En el caso del calor, un aspecto interesante fue la rápida pérdida de viabilidad tras un minuto de tratamiento a 95 °C de los esporos, en todos los tiempos de germinación con los tres agentes germinantes. Además, se observó correlación entre dicha inactivación inicial y la cantidad de esporos germinados, evaluando la germinación mediante un tratamiento térmico de 10 min a 70°C, en el caso de la germinación inducida por nutrientes. Además, al estudiar las cinéticas de inactivación de los esporos expuestos a los tres agentes, se observó que con ácido y Ca-DPA, la termorresistencia disminuía progresivamente, mientras que en el caso de los nutrientes, los valores D fueron similares para todos los tiempos de exposición estudiados. Este fenómeno podría deberse a que los nutrientes desencadenan cambios globales en los esporos, que podrían justificar una

sensibilización severa frente al calor, en un mecanismo de tipo todo o nada. Sin embargo, en el caso de los esporos germinados mediante exposición a la acidez y al Ca-DPA parecían generarse esporos con distinta sensibilidad al calor.

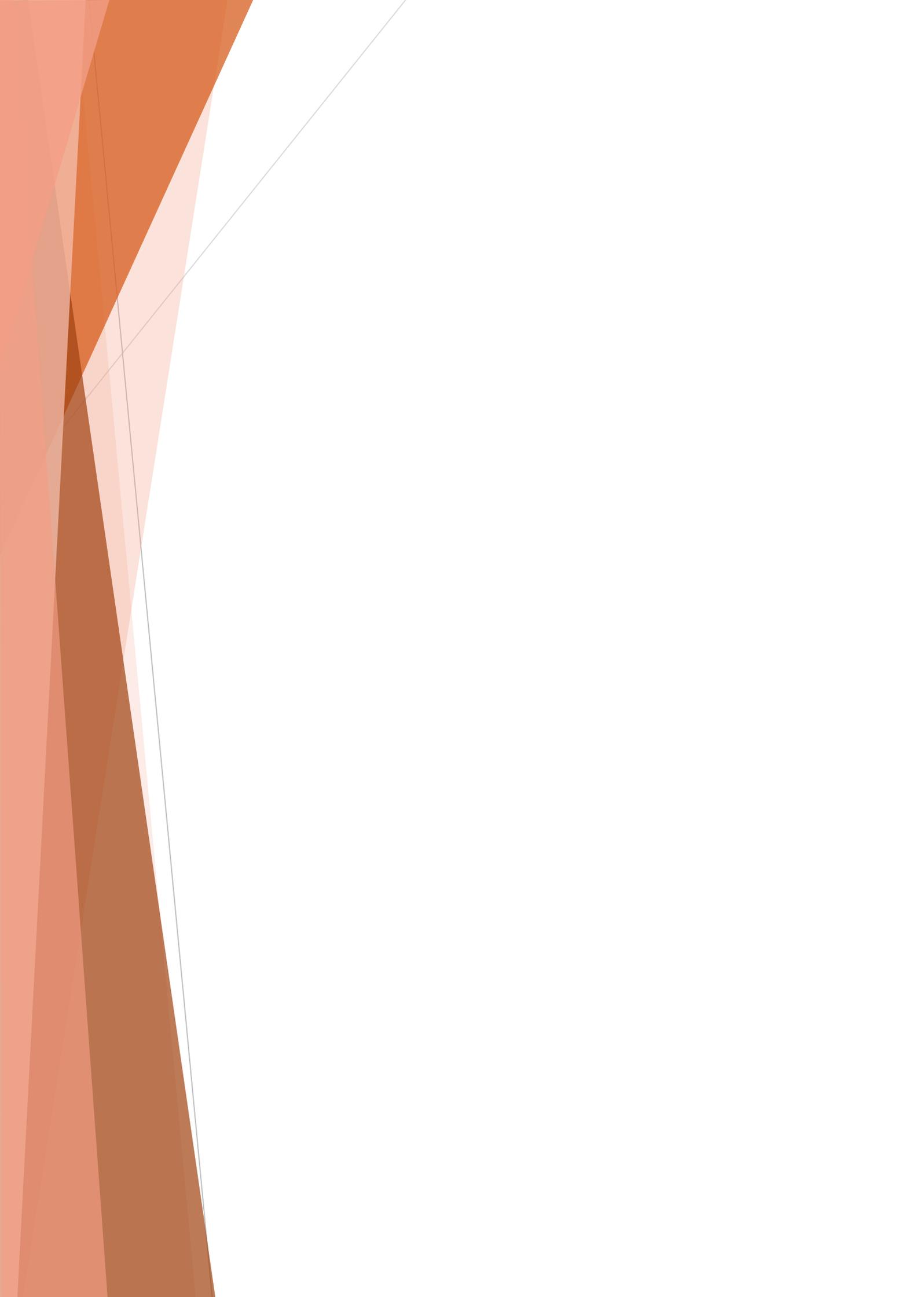
En el caso de los tratamientos con pulsos eléctricos de alto voltaje, no se observó inactivación de los esporos parcialmente germinados con ninguno de los tres agentes. Por tanto, es posible que la adquisición de sensibilidad frente a esta tecnología se produzca en la fase de desarrollo de los esporos germinados, es decir, una fase mucho más tardía.

Por último, en la radiación ultravioleta, al igual de lo observado con los tratamientos de PEAV, no se observaron cambios relevantes en la resistencia de los esporos germinantes. Sí que se observaron pequeños cambios en la resistencia, posiblemente debidos al efecto sensibilizador del DPA liberado durante la germinación, o a otros cambios celulares, como puede ser la degradación de las proteínas SASPs que protegen el DNA, pero de pequeña magnitud.

Para resumir, los resultados obtenidos en este capítulo muestran que la resistencia de los esporos parcialmente germinados es notablemente mayor que la de las células vegetativas. Esta afirmación es aplicable a tres tecnologías, calor, PEAV y UV, cuyo modo de acción es muy diferente. En el caso de los tratamientos por PEAV y por UV, probablemente sea necesario que el proceso de germinación se encuentre muy avanzado para que el esporo muestre sensibilización. En nuestro estudio, de hecho, no hemos podido mostrar tal sensibilización.

Por otro lado, y aunque estas observaciones han de tomarse con precaución dada la dificultad de comparar tecnologías tan diferentes en cuanto a su modo de acción y su naturaleza, los resultados parecen indicar que los tratamientos térmicos logran inactivar esporos germinados, que los tratamientos de PEAV y de UV no consiguen. Por lo tanto, aquellos cambios inducidos en los esporos por efecto del proceso de germinación parecen tener un efecto de gran magnitud en la resistencia al calor, pero no en la resistencia a las otras dos tecnologías. Quizás el modo de acción de cada una de ellas, multidiana en el caso del calor, y centrado en dos estructuras muy específicas en el caso de los PEAV (membrana) y en los UV (ADN), puedan explicar este diferente comportamiento observado.

4.6. Estudio de la influencia de la temperatura de esporulación de *B. subtilis* en la germinación



La esporulación es un proceso complejo que, al igual que el crecimiento bacteriano, está condicionado por las condiciones ambientales, como la temperatura, el pH y la actividad de agua (Bressuire-Isoard y col., 2018). Las condiciones en las que se produce la esporulación, además de influir en el rendimiento, es decir el número de células vegetativas que finalmente esporulan, influye también en las características del esporo resultante. El rendimiento de la esporulación normalmente es mayor en las condiciones óptimas de crecimiento, además al alejarse de dicho óptimo la esporulación suele alargarse en el tiempo (Minh y col., 2011). Xu Zhou y col. (2017) observaron que también las condiciones ambientales durante la esporulación, como la temperatura, el pH o la concentración de sales, influían en el tamaño de los esporos obtenidos. Las características fisiológicas de los esporos también se ven influidas por las condiciones de esporulación, por ejemplo, una mayor concentración de iones en el medio de esporulación conlleva una menor hidratación del protoplasto (Cazemier y col., 2001). Ramirez-Peralta y col. (2012) observaron que, al emplear un medio pobre en nutrientes, los esporos tenían menor cantidad de receptores de la germinación que los esporos esporulados en medios más ricos en nutrientes.

No obstante, la temperatura de esporulación es uno de los factores que más condiciona las características de los esporos (Bressuire-Isoard y col., 2018). Los esporos preparados a mayor temperatura suelen tener el protoplasto menos hidratado (Beaman y Gerhardt, 1986; Gerhardt, 1989; Melly y col., 2002; Minh y col., 2011). Planchon y col. (2011) observaron que los esporos de *B. cereus* esporulado a 30°C contenían mayor cantidad de DPA que los esporulados a 10°C. También el grado de mineralización del protoplasto parece estar condicionado por la temperatura de esporulación (Palop y col., 1999). Por otro lado, Melly y col. (2002) observaron también diferencias en el córtex y la cubierta entre esporos preparados a diferente temperatura. También el tamaño de los esporos se ve influenciado por la temperatura de esporulación, siendo menor a mayor temperatura (Xu Zhou y col., 2017).

Otro aspecto que varía en los esporos en función de la temperatura de esporulación es la composición lipídica de su membrana interna. Planchon y col. (2011) observaron que la cantidad total de ácidos grasos anteiso (ai13, ai15 y ai17) en esporos de *B. cereus* esporulados a 10 °C era significativamente mayor que la de los esporulados a 30°C y, por tanto, la relación entre ácidos grasos anteiso/iso era mayor a menor temperatura. Esta mayor relación anteiso/iso a menor temperatura de esporulación también ha sido descrita

en esporos de *B. subtilis* (Cortezzo y Setlow, 2005), así como una mayor cantidad de ácidos grasos insaturados a menor temperatura de esporulación (Cortezzo y Setlow, 2005). Estas modificaciones en la membrana interna en función de la temperatura, también se han descrito en células vegetativas y previsiblemente su función es mantener la fluidez de la membrana (Bressuire-Isoard y col., 2018).

Por otro lado, dadas las modificaciones estructurales que se producen en los esporos en función de la temperatura de esporulación, no es de extrañar que también la resistencia frente a diversos agentes se vea influenciada por la temperatura de esporulación. Los tratamientos en los que más se ha descrito este fenómeno son los tratamientos térmicos (Baweja y col., 2008; Beaman y Gerhardt, 1986; Minh y col., 2011; Planchon y col., 2011). No obstante, también se ve afectada la resistencia frente a otros agentes como el ácido nítrico, que es mayor a mayor temperatura de esporulación (Cortezzo y Setlow, 2005). Temperaturas elevadas de esporulación también resultan en mayor resistencia de los esporos frente a peróxido de hidrógeno, formaldehído y glutaraldehído, entre otros (Melly y col., 2002).

Además, la temperatura de esporulación también se ha asociado con cambios en la germinación de los esporos. El efecto en la germinación se da como consecuencia del efecto en las estructuras del esporo y/o en los compuestos sintetizados durante la germinación y que están directa o indirectamente relacionados con la germinación (Gounina-Allouane y col., 2008). La temperatura de esporulación se ha descrito que puede producir cambios en la cubierta de esporos de *B. subtilis* (Melly y col., 2002) y estos cambios podrían producir cambios en el comportamiento de los esporos durante la germinación, ya que algunas proteínas de esta envoltura están relacionadas con la germinación; algunos esporos mutantes en proteínas de la cubierta muestran deficiencias en la germinación (Bagyan y Setlow, 2002; McPherson y col., 2005; Takamatsu y Watabe, 2002).

Se ha asociado una elevada tasa o eficiencia de germinación con temperaturas de esporulación tanto bajas como altas, en función de la cepa, el germinante y las condiciones empleadas (Bressuire-Isoard y col., 2018). En *B. cereus* se observó que aquellos esporos producidos a 15 y 20 °C tenían mayor capacidad para germinar con inosina y L-alanina que los esporos producidos a 37 °C, es decir, necesitaban menor concentración de nutrientes para germinar (Gounina-Allouane y col., 2008). Por su parte,

Ramirez-Peralta y col. (2012) observaron una mayor velocidad de germinación con nutrientes en esporos preparados a mayor temperatura, y lo asociaron con una mayor cantidad de receptores de la germinación en los esporos preparados a 37 °C en relación a los esporulados a 23 °C.

En este capítulo se estudia el efecto de la temperatura de esporulación de *B. subtilis* en la germinación con nutrientes, Ca-DPA y acidez, utilizando para ello esporos obtenidos a dos temperaturas, 30 y 42°C. Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (25°C), a no ser que se indiquen otras condiciones en el texto. Seguidamente se estudiaron diversas características fisiológicas relacionadas principalmente con la membrana interna, con objeto de poder explicar el comportamiento observado.

En la Figura 4.6.1 se muestran las curvas de germinación mediante la exposición a nutrientes (CNYE) de las suspensiones obtenidas a 30 y a 42°C. Como se puede observar en la Figura, la germinación con nutrientes fue más rápida en los esporos obtenidos a 42 °C, es decir, a la temperatura más alta ($p < 0,05$). Este fenómeno ya ha sido descrito previamente y parece que podría deberse a que, a mayor temperatura de esporulación, los esporos contienen una mayor cantidad de receptores de la germinación (Ramirez-Peralta y col., 2012). Sin embargo, también se ha descrito el efecto contrario, es decir que con temperaturas más elevadas de esporulación se obtendrían esporos con menor capacidad de germinación mediante exposición a dodecilamina y nutrientes (Cortezzo y Setlow, 2005; Gounina-Allouane y col., 2008). Por tanto, parece que hay mucha controversia sobre el efecto de la temperatura de esporulación en la germinación. Una posible explicación sería que podría ser dependiente de la especie y de la cepa o incluso podría estar condicionado por otros factores como la riqueza en nutrientes del medio de esporulación.

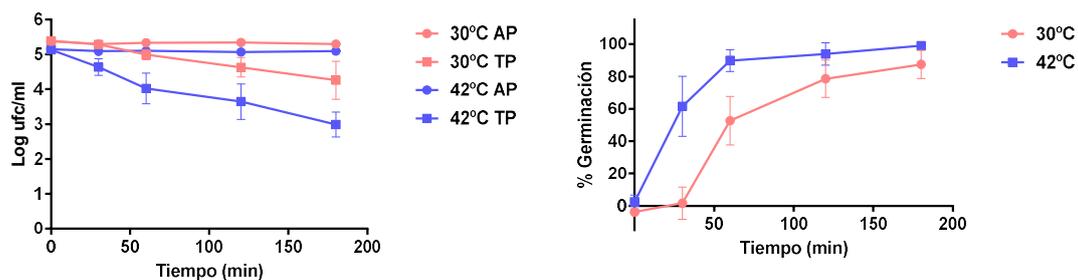


Figura 4.6.1. Estudio de la germinación en caldo nutritivo con extracto de levadura de esporos de *B. subtilis* esporulados a 30 °C (rojo) y 42 °C (azul). (●) recuento directo y (■) recuento tras pasterización (75 °C durante 10 minutos). La gráfica de la derecha representa el porcentaje de germinación de esporos obtenidos a 30 °C (rojo) y 42 °C (azul).

Por otro lado, se estudió también el efecto de la temperatura de esporulación en la germinación mediante exposición a ácido (Figura 4.6.2) y a Ca-DPA (Figura 4.6.3), ya que estos agentes no son dependientes de los receptores de la germinación, que es el mecanismo por el que se ha descrito que influye en la germinación con nutrientes. Además, en la bibliografía no se ha encontrado apenas información sobre este aspecto en la germinación no inducida por nutrientes.

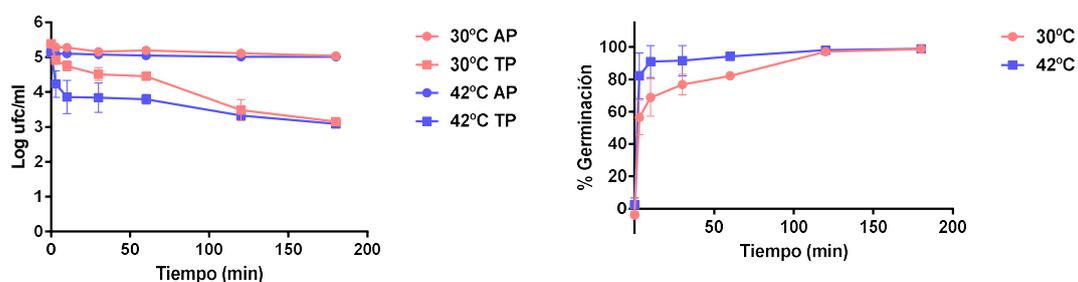


Figura 4.6.2. Estudio de la germinación en HCl de esporos de *B. subtilis* esporulados a 30 °C (rojo) y 42 °C (azul). (●) recuento directo y (■) recuento tras pasterización (75 °C durante 10 minutos). La gráfica de la derecha representa el porcentaje de germinación de esporos obtenidos a 30 °C (rojo) y 42 °C (azul).

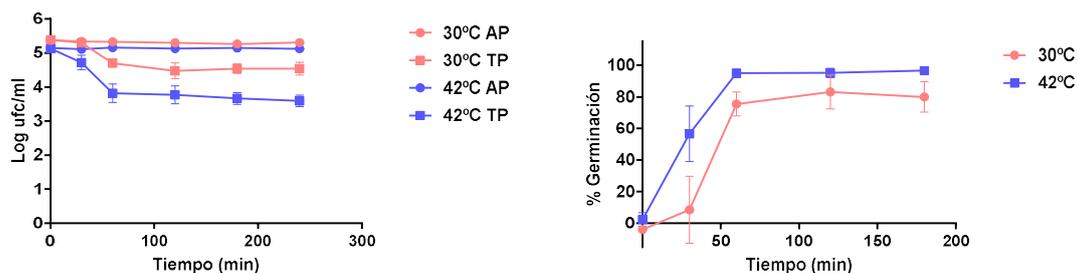


Figura 4.6.3. Estudio de la germinación en Ca-DPA de esporos de *B. subtilis* esporulados a 30 °C (rojo) y 42 °C (azul). (●) recuento directo y (■) recuento tras pasterización (75 °C durante 10 minutos). La gráfica de la derecha representa el porcentaje de germinación de esporos obtenidos a 30 °C (rojo) y 42 °C (azul).

En ambos casos, al igual que se había observado con la exposición a nutrientes, los esporos obtenidos a la temperatura más alta germinaron de forma más rápida ($p < 0,05$). Aunque el mecanismo concreto por el que esto podría ocurrir no se conoce, sí que parece que se ha aceptado la hipótesis de que la temperatura de esporulación podría ejercer una influencia en las estructuras del espora, lo que podría afectar a la capacidad de germinación, como es el caso de las proteínas de la cubierta y la permeabilidad de la membrana interna. Melly y col. (2002) observaron que la temperatura de esporulación podía afectar a la composición de las proteínas de la cubierta de *B. subtilis*. Por otro lado Black y col. (2005) observaron también cambios en la permeabilidad de la membrana interna en esporos de *B. subtilis* obtenidos a distintas temperaturas.

El germinante donde fue más evidente la diferencia de comportamiento en cuanto a velocidad de germinación fue en el caso los nutrientes, es por ello que fue la seleccionada para el resto de pruebas. Para estudiar si el estado de la membrana podría estar relacionado con la velocidad de germinación, se decidió realizar las pruebas de germinación con nutrientes a otras temperaturas, 30 y 42 °C, de ambas suspensiones. Al variar la temperatura de exposición a los nutrientes, previsiblemente, se modificaría la fluidez de la membrana y se observarían diferencias en la velocidad de germinación. Además, previsiblemente y de acuerdo a la teoría de adaptación homeoviscosa, la fluidez de una membrana obtenida a 30 °C y termostatada a 30°C, debería ser equivalente a la fluidez de una membrana biológica obtenida a 42 °C y termostatada a 42 °C. La Figura 4.6.4 muestra los resultados obtenidos. Las gráficas A y B muestran la comparación entre

los porcentajes de germinación de los esporos obtenidos a 30 y a 42°C expuestos a la germinación por nutrientes a 30°C (A) y a 42°C (B). Las gráficas C y D ilustran el efecto de la temperatura de germinación (desde 25 hasta 42°C), tanto para aquellos esporos obtenidos a 30° C (C) como a 42 °C (D). Por último, la gráfica E permite comparar los porcentajes de germinación de esporos obtenidos y germinados a 30° C con los obtenidos y germinados a 42 °C, presumiblemente con un nivel equivalente de fluidez de membrana.

Como se puede apreciar en la Figura 4.6.4, en la suspensión obtenida a 30 °C se observó mayor porcentaje de germinación cuando el tratamiento con nutrientes tuvo lugar a 42 °C ($p < 0,05$). Por otro lado, en los esporos obtenidos a 42 °C, las diferencias encontradas fueron más sutiles, aunque también en este caso la velocidad de germinación fue mayor a mayor temperatura ($p < 0,05$ únicamente tras 30 minutos). De hecho, como se puede observar en las gráficas de la Figura 4.6.4, la temperatura de esporulación ejerció un efecto de mayor magnitud que la temperatura de germinación. Por otro lado, la Figura 4.6.4E sugiere que la fluidez de la membrana, bajo las condiciones utilizadas en este estudio, no sería un factor esencial y único que determine la velocidad de germinación, ya que esporos obtenidos y germinados a 42 °C germinaban más rápidamente que esporos obtenidos y germinados a 30°C ($p < 0,05$).

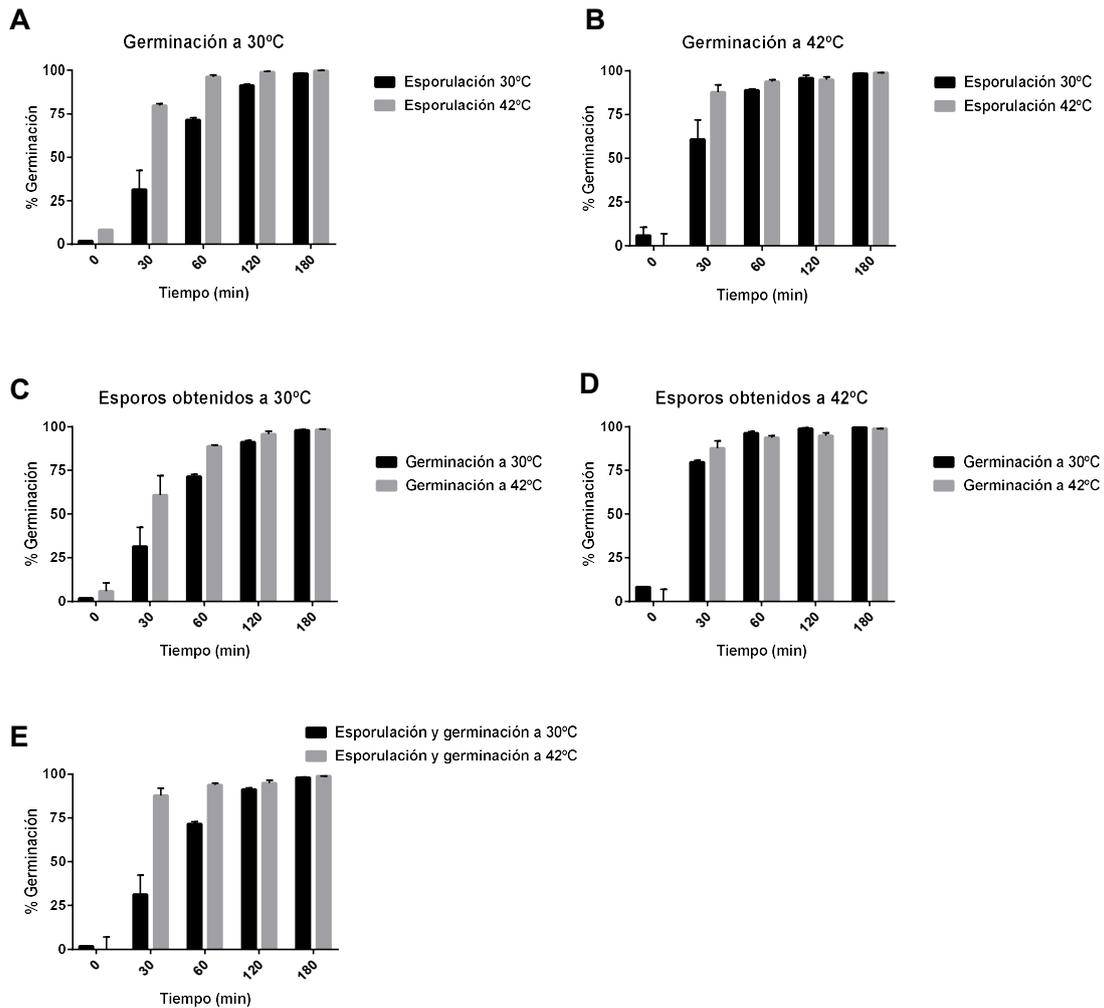


Figura 4.6.4. Germinación con nutrientes a 30 °C y 42 °C de esporos producidos a 30 °C (negro) y 42 °C (gris). Las gráficas A y B muestran los porcentajes de germinación de los esporos obtenidos a dos temperaturas y germinados a 30 °C (A) y 42 °C (B); las gráficas C y D muestran los datos correspondientes a la germinación a 30 y 42 °C de los esporos obtenidos a 30 °C (C) y 42 °C (D) y la gráfica E corresponde a los porcentajes de germinación de esporos obtenidos y germinados a la misma temperatura.

Con objeto de profundizar en este aspecto, se estudió la permeabilidad y la fluidez de la membrana interna de los esporos nativos obtenidos a las dos temperaturas objeto de estudio. En el primer caso se utilizó la tinción con IP como indicador de permeabilidad de membrana, y en el segundo, se realizaron medidas de anisotropía de fluorescencia de los esporos teñidos con la sonda lipofílica DPH (de Sarrau y col., 2012), y medidas de polarización generalizada de los esporos teñidos con la sonda Laurdan (Hofstetter y col.,

2012), también lipofílica. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 4.6.5, 4.6.6, 4.6.7 y 4.6.8.

La Figura 4.6.5 incluye la evolución de la tinción con IP de los esporos obtenidos a 30 y a 42 a lo largo de la curva de germinación (obtenida en condiciones estándar, es decir, 25°C). La Figura muestra cómo el comportamiento fue distinto, de manera que en los esporos obtenidos a 30°C se observaba un incremento progresivo en el porcentaje de esporos cuya membrana interna estaba permeabilizada, mientras que en aquellos esporos obtenidos a 42°C apenas se producían cambios. No obstante, quizás lo más relevante de esta comparación es que los esporos nativos, es decir sin exponer a la acción de los nutrientes, ya mostraban un diferente grado de permeabilidad, que se puede observar claramente en la Figura 4.6.6. Los esporos obtenidos a 42 °C presentaban una membrana interna más permeable al IP ($p < 0,05$). Este grado de permeabilización podría estar relacionado con la mayor velocidad de germinación de estos esporos bajo todas las condiciones experimentales utilizadas, y apenas se modificaba durante el proceso de germinación posterior (Figura 4.6.5). Los esporos obtenidos a 30°C presentaban una membrana interna menos permeable inicialmente, pero que se permeabilizaba progresivamente con el curso de la germinación.

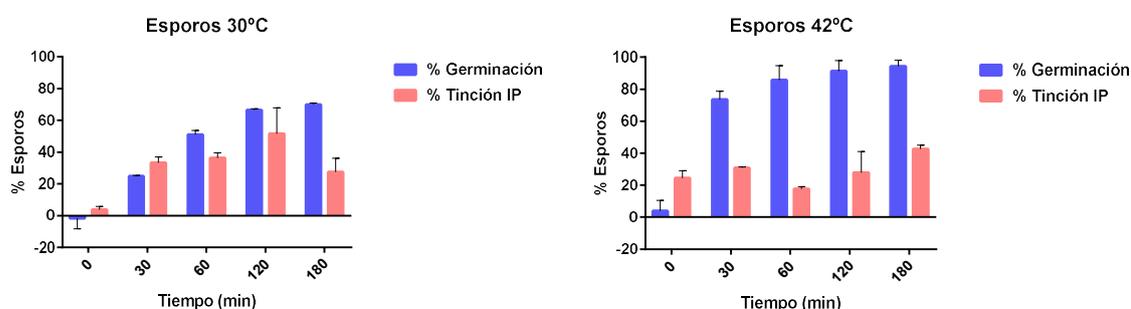


Figura 4.6.5. Porcentajes de germinación (azul) y de tinción con IP (rojo) de esporos obtenidos a 30 °C (izquierda) y 42 °C (derecha).

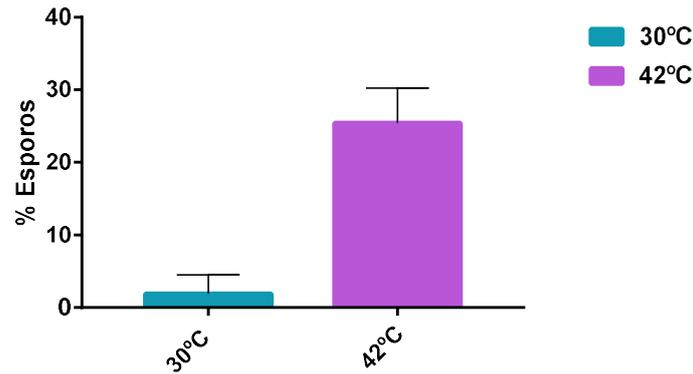


Figura 4.6.6. Porcentajes de esporos nativos de *B. subtilis* esporulado a 30 °C (negro) y 42 °C (gris) teñidos con IP (izquierda).

Sin embargo, los resultados de fluidez de membrana no mostraron diferencias entre ambas poblaciones celulares. La Figura 4.6.7 muestra los valores de anisotropía de fluorescencia obtenidos a partir de esporos obtenidos a 30 y a 42 °C, teñidos con el colorante DPH, y termostatados a diferentes temperaturas entre 30 y 60°C. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ni entre las suspensiones de esporos obtenidos a 30 y a 42 ($p>0,05$), ni entre los datos obtenidos a diferentes temperaturas ($p>0,05$).

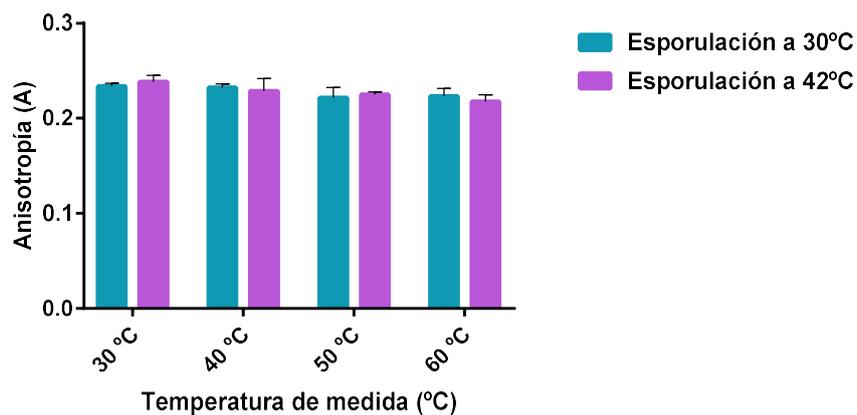


Figura 4.6.7. Medidas de anisotropía, a varias temperaturas, de esporos de *B. subtilis* esporulados a 30 y 42 °C.

También se obtuvieron datos de polarización generalizada de los esporos teñidos con Laurdan, que se muestran en la Figura 4.6.8.

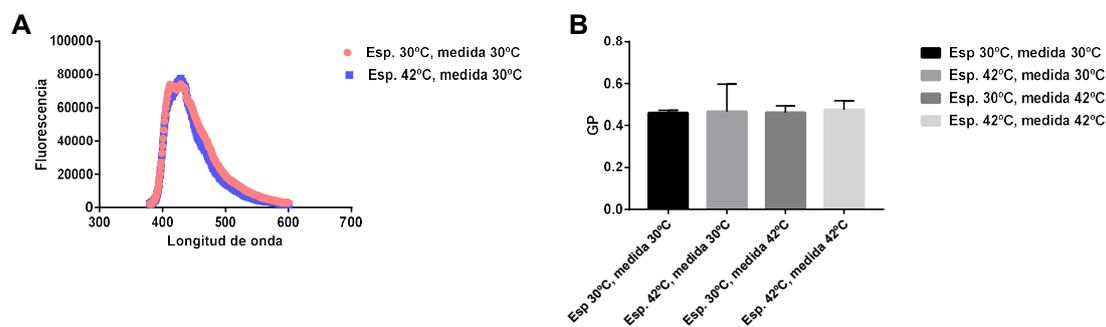


Figura 4.6.8. Espectros de absorción de esporos esporulados con lauridan a 30 y 42 °C (A) y valores de polarización generalizada de esporos obtenidos con lauridan a 30 y 42 °C y termostatados a 30 y 42 °C (B).

La Figura 4.6.8A incluye una comparación de los espectros de absorción de los esporos obtenidos en presencia de Laurdan a 30 y a 42 °C. Como se puede observar ambos espectros prácticamente se superponen, sugiriendo la inexistencia de diferencias entre ambas poblaciones celulares. La Figura 4.6.8B incluye los valores de polarización generalizada calculados para esporos obtenidos a 30 y a 42°C, y termostatados a diferentes temperaturas. Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$), al igual que en el caso de la tinción con DPH.

Por lo tanto, los resultados obtenidos no permiten afirmar que existan diferencias en la fluidez de las membranas de los esporos obtenidos a 30 y a 42 °C. Tampoco se pudieron encontrar diferencias debidas a la temperatura de medida en el rango estudiado, aunque se observó cierta tendencia a la disminución de la anisotropía al aumentar la temperatura exterior (Figura 4.6.7). Estos resultados podrán deberse a que la membrana interna se encuentra en un estado de compactación extrema en los esporos, de manera que no sería posible encontrar diferencias, al menos con la técnica utilizada. Por otro lado, quizás sea necesario incrementar la temperatura externa por encima de un determinado umbral para poder empezar a detectar cambios en la movilidad de los lípidos de la membrana en los esporos, umbral que podría ser muy superior al de las células vegetativas de origen.

En cualquier caso, los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que la fluidez de la membrana interna no sería un factor esencial en la germinación de los esporos de *B. subtilis*, si bien, no podemos descartar que otras propiedades de membrana puedan ejercer un papel importante, dada la diferencia encontrada en la tinción con yoduro de propidio entre esporos capaces de germinar a distinta velocidad.

Por otro lado, la temperatura de esporulación podría afectar a otras estructuras o composición de los esporos, por ejemplo, Planchon y col. (2011) observaron que los esporos de *B. cereus* producidos a menor temperatura (10 °C) contenían menor cantidad de DPA que los obtenidos a temperatura más elevada (30 °C). Además, los esporos obtenidos a 10 °C respondían mejor a algunos nutrientes que los esporos de 30 °C. En esta investigación se decidió medir la concentración intracelular de DPA de las dos suspensiones de esporos (Figura 4.6.9).

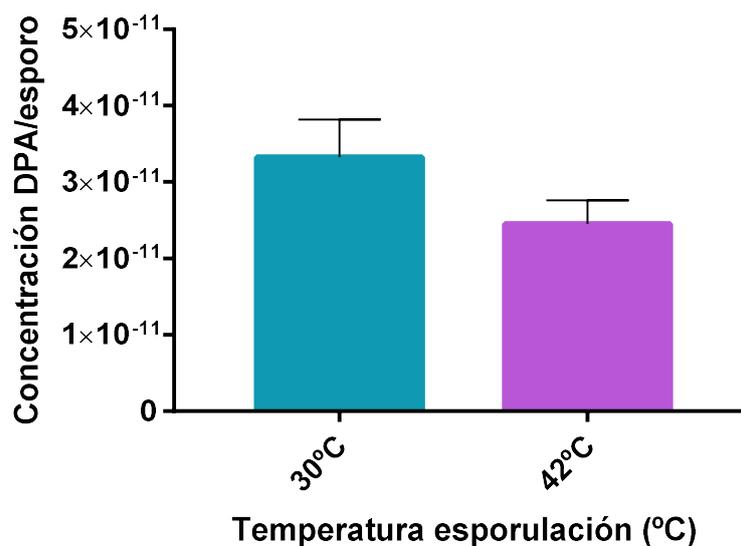
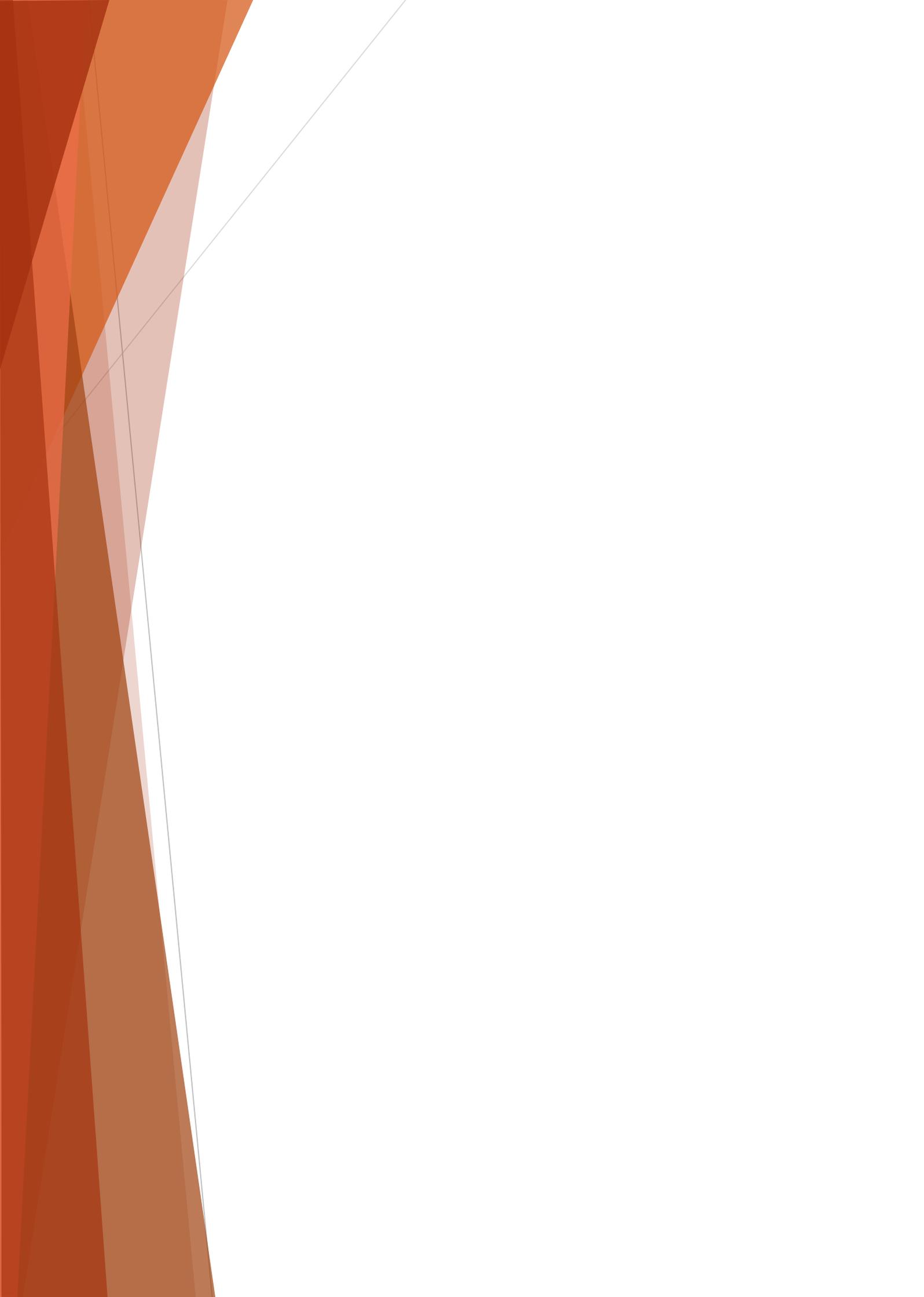


Figura 4.6.9. Concentración de DPA (mg/ml) por unidad de espora en esporos obtenidos a 30 y a 42 °C.

Como se muestra en la Figura, los esporos obtenidos a menor temperatura mostraban mayor contenido de DPA en su protoplasto que los esporulados a 42 °C ($p < 0,05$). Por tanto, los esporos que más rápido germinaban (42 °C) eran los que mostraban menor contenido de DPA. Estos resultados coinciden con los observados por Planchon y col. (2011), aunque no podemos afirmar que el efecto observado en la

germinación se deba al mayor o menor contenido de DPA. Serán necesarias más investigaciones para esclarecer el papel del contenido neto de DPA y su cinética de salida a través de una membrana interna más o menos permeabilizada en la capacidad de germinación de los esporos latentes.

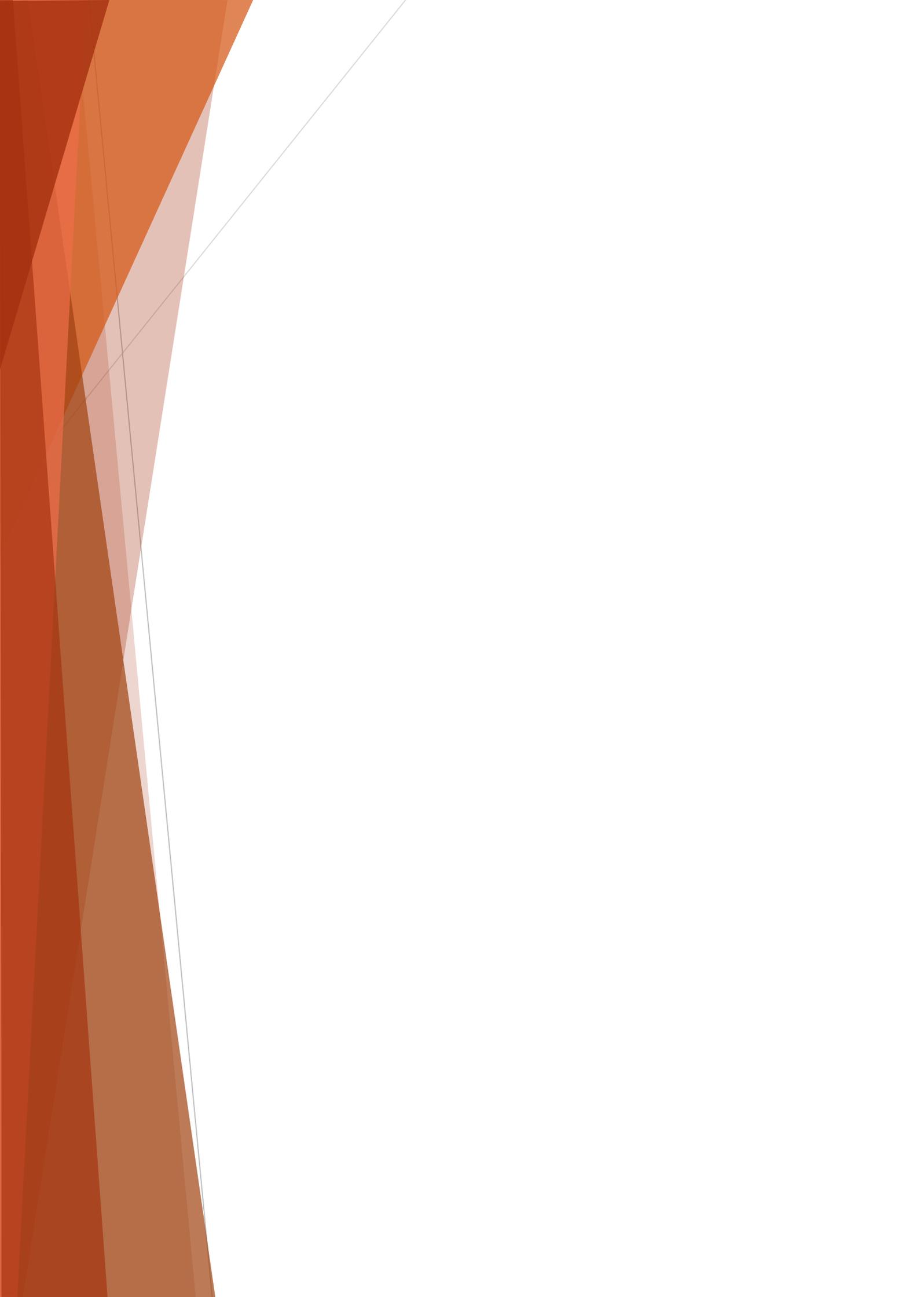
5. Conclusiones



1. La duración de los hombros en las gráficas de supervivencia es una función exponencial de la temperatura de tratamiento. Existe una relación entre los parámetros Sl y Dt que se mantiene constante a todas las temperaturas de tratamiento. Esta relación es característica de la especie microbiana investigada, siendo superior, de entre cinco especies estudiadas esporuladas en condiciones óptimas, para *G. stearothermophilus*.
2. En *G. stearothermophilus*, la relación Sl/Dt es máxima en los esporos obtenidos a la temperatura óptima de esporulación, y en este caso, independiente del pH de tratamiento.
3. Los tratamientos con calor, Ca-DPA y HCl son capaces de activar los esporos superlatentes de *G. stearothermophilus*, mientras que los tratamientos con HHP, PEAV y UV, en las condiciones estudiadas, no lo son.
4. El modelo matemático propuesto para describir cinéticas de activación e inactivación de esporos por calor muestra mejores ajustes que los modelos encontrados en la bibliografía. Los modelos matemáticos que pretenden determinar el perfil de las gráficas de supervivencia de esporos bacterianos deberían considerar además del fenómeno de activación, los fenómenos de daño y recuperación celular.
5. La velocidad de activación por calor de *G. stearothermophilus* es una función exponencial de la temperatura de tratamiento. La velocidad de los fenómenos de activación y de inactivación por el calor es diferente y su relación es dependiente del pH de tratamiento.
6. Los esporos de *B. subtilis* son capaces de germinar en presencia de nutrientes, así como con tratamientos con Ca-DPA, HHP y HCl, pero los tratamientos con PEAV y radiaciones UV, en las condiciones utilizadas, no son capaces de inducir la germinación, ni cambios fisiológicos y estructurales.
7. Durante la germinación de *B. subtilis* la salida de DPA y la entrada de agua en el protoplasto, seguida de la pérdida de termorresistencia son eventos tempranos, mientras que la degradación del córtex es un evento más tardío. Durante la germinación de *B. subtilis*, principalmente cuando está mediada por nutrientes, se produce la tinción con yoduro de propidio de algunos esporos, lo que sugiere que la membrana interna se permeabiliza, y podría tener alguna función en el proceso de germinación.

8. Los esporos de *B. subtilis* parcialmente germinados muestran una resistencia superior a la de las células vegetativas frente al calor, PEAV y radiaciones UV. Además, el momento en el que se pierde la resistencia, y la cinética de sensibilización, parece depender del germinante empleado.
9. Los esporos de *B. subtilis* obtenidos a la temperatura más alta, 42 °C, muestran una mayor velocidad de germinación que los obtenidos a 30 °C, y mayor permeabilización de la membrana interna, atendiendo a la tinción con IP. No se han encontrado diferencias en la fluidez de membrana entre las suspensiones de esporos de *B. subtilis* preparadas a diferente temperatura, pero sí diferente contenido en DPA en el protoplasto.

Bibliografía



- Abhyankar, W., Pandey, R., Ter Beek, A., Brul, S., de Koning, L.J., de Koster, C.G., 2015. Reinforcement of *Bacillus subtilis* spores by cross-linking of outer coat proteins during maturation. *Food Microbiology* 45, 54-62.
- Adams, D.M., 1978. Heat injury of bacterial spores, *Advances in applied microbiology*. Elsevier, pp. 245-261.
- Alimova, A., Katz, A., Gottlieb, P., Alfano, R.R., 2006. Proteins and dipicolinic acid released during heat shock activation of *Bacillus subtilis* spores probed by optical spectroscopy. *Applied Optics* 45, 445-450.
- André, S., Vallaëys, T., Planchon, S., 2017. Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. *Research in Microbiology* 168, 379-387.
- André, S., Zuber, F., Remize, F., 2013. Thermophilic spore-forming bacteria isolated from spoiled canned food and their heat resistance. Results of a French ten-year survey. *International Journal of Food Microbiology* 165, 134-143.
- Appert, C., 1811. *L'Art de conserver pendant plusieurs années toutes les substances animales et végétales*, etc.
- Atrih, A., Foster, S.J., 1999. The role of peptidoglycan structure and structural dynamics during endospore dormancy and germination. *Antonie van Leeuwenhoek* 75, 299-307.
- Bagyan, I., Setlow, P., 2002. Localization of the cortex lytic enzyme CwlJ in spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 184, 1219-1224.
- Barsotti, L., Cheftel, J.C., 1999. Food processing by pulsed electric fields. II. Biological aspects. *Food Reviews International* 15, 181-213.
- Baweja, R.B., Zaman, M.S., Mattoo, A.R., Sharma, K., Tripathi, V., Aggarwal, A., Dubey, G.P., Kurupati, R.K., Ganguli, M., Chaudhury, N.K., Sen, S., Das, T.K., Gade, W.N., Singh, Y., 2008. Properties of *Bacillus anthracis* spores prepared under various environmental conditions. *Archives of Microbiology* 189, 71-79.
- Beaman, T.C., Gerhardt, P., 1986. Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization, and thermal adaptation. *Applied Environmental Microbiology* 52, 1242-1246.
- Beaman, T.C., Pankratz, H.S., Gerhardt, P., 1988. Heat shock affects permeability and resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Applied Environmental Microbiology* 54, 2515-2520.
- Bender, G.R., Marquis, R.E., 1985. Spore heat resistance and specific mineralization. *Applied Environmental Microbiology* 50, 1414-1421.
- Bennett, S.D., Walsh, K.A., Gould, L.H., 2013. Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*—United States, 1998–2008. *Clinical Infectious Diseases* 57, 425-433.
- Berendsen, E.M., Boekhorst, J., Kuipers, O.P., Wells-Bennik, M.H., 2016. A mobile genetic element profoundly increases heat resistance of bacterial spores. *ISME Journal* 10, 2633-2642.
- Berendsen, E.M., Koning, R.A., Boekhorst, J., de Jong, A., Kuipers, O.P., 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 Tn1546 Transposon. *Frontiers Microbiology* 7, 1912.

- Berg, R., Sandine, W., 1970. Activation of bacterial spores. A review. *Journal of Milk and Food Technology* 33, 435-441.
- Bevilacqua, A., Ciuffreda, E., Sinigaglia, M., Corbo, M.R., 2015. Spore inactivation and DPA release in *Alicyclobacillus acidoterrestris* under different stress conditions. *Food Microbiology* 46, 299-306.
- Bigelow, W., 1921. The logarithmic nature of thermal death time curves. *The Journal of Infectious Diseases*, 528-536.
- Black, E.P., Koziol-Dube, K., Guan, D., Wei, J., Setlow, B., Cortezzo, D.E., Hoover, D.G., Setlow, P., 2005. Factors influencing germination of *Bacillus subtilis* spores via activation of nutrient receptors by high pressure. *Applied Environmental Microbiology* 71, 5879-5887.
- Boland, F.M., Atrih, A., Chirakkal, H., Foster, S.J., Moir, A., 2000. Complete spore-cortex hydrolysis during germination of *Bacillus subtilis* 168 requires SleB and YpeB. *Microbiology* 146 (Pt 1), 57-64.
- Borch-Pedersen, K., Mellegård, H., Reineke, K., Boysen, P., Sevenich, R., Lindbäck, T., Aspholm, M., 2017. Correction for Borch-Pedersen et al., "Effects of High Pressure on *Bacillus licheniformis* Spore Germination and Inactivation". *Applied Environmental Microbiology* 83.
- Bressuire-Isoard, C., Broussolle, V., Carlin, F., 2018. Sporulation environment influences spore properties in *Bacillus*: evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms. *FEMS Microbiology Reviews* 42, 614-626.
- Briggs, A., Yazdany, S., 1970. Effect of sodium chloride on the heat and radiation resistance and on the recovery of heated or irradiated spores of the genus *Bacillus*. *Journal of Applied Bacteriology* 33, 621-632.
- Brown, M.R., Brown, M.W., Porter, G.S., 1968. Activation of *Bacillus stearothermophilus* spores and release of dipicolinic acid after hydrochloric acid treatment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 20, 80.
- Brunt, J., Cross, K.L., Peck, M.W., 2015. Apertures in the *Clostridium sporogenes* spore coat and exosporium align to facilitate emergence of the vegetative cell. *Food Microbiology* 51, 45-50.
- Burns, D.A., Heap, J.T., Minton, N.P., 2010. SleC is essential for germination of *Clostridium difficile* spores in nutrient-rich medium supplemented with the bile salt taurocholate. *Journal of bacteriology* 192, 657-664.
- Cabrera-Martínez, R.M., Tovar-Rojo, F., Vepachedu, V.R., Setlow, P., 2003. Effects of overexpression of nutrient receptors on germination of spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 185, 2457-2464.
- Carlin, F., 2011. Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food Microbiology* 28, 177-182.
- Carr, K.A., Janes, B.K., Hanna, P.C., 2010. Role of the gerP operon in germination and outgrowth of *Bacillus anthracis* spores. *PLoS One* 5, e9128.
- Cazemier, A.E., Wagenaars, S.F., ter Steeg, P.F., 2001. Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli. *Journal of Applied Microbiology* 90, 761-770.
- Cerf, O., 1977. A review tailing of survival curves of bacterial spores. *Journal of Applied Bacteriology* 42, 1-19.

- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71, 1-20.
- Coleman, W.H., De, C., Li, Y.Q., Cowan, A.E., Setlow, P., 2007. How moist heat kills spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* 189, 8458-8466.
- Coleman, W.H., Setlow, P., 2009. Analysis of damage due to moist heat treatment of spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Microbiology* 106, 1600-1607.
- Coleman, W.H., Zhang, P., Li, Y.Q., Setlow, P., 2010. Mechanism of killing of spores of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium* by wet heat. *Letters in Applied Microbiology* 50, 507-514.
- Condón-Abanto, S., Arroyo, C., Alvarez, I., Condón, S., Lyng, J.G., 2016. Application of ultrasound in combination with heat and pressure for the inactivation of spore forming bacteria isolated from edible crab (*Cancer pagurus*). *International Journal of Food Microbiology* 223, 9-16.
- Condón, S., Arrizubieta, M.J., Sala, F.J., 1993. Microbial Heat-Resistance Determinations by the Multipoint System with the Thermoresistometer Tr-Sc - Improvement of This Methodology. *Journal of Microbiological Methods* 18, 357-366.
- Condón, S., Palop, A., Raso, J., 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, 149-152.
- Conesa, R., Andreu, S., Fernandez, P.S., Esnoz, A., Palop, A., 2009. Nonisothermal heat resistance determinations with the thermoresistometer Mastia. *Journal of Applied Microbiology* 107, 506-513.
- Cook, A., Gilbert, R., 1968. Factors affecting the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *International journal of food science & technology* 3, 285-293.
- Cook, A.M., Gilbert, R.J., 1969. The effect of sodium chloride on heat resistance and recovery of heated spores of *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Applied Bacteriology* 32, 96-102.
- Coroller, L., Leguérinel, I., Mafart, P., 2001. Effect of Water Activities of Heating and Recovery Media on Apparent Heat Resistance of *Bacillus cereus* Spores. *Applied Environmental Microbiology* 67, 317-322.
- Corradini, M.G., Normand, M.D., Eisenberg, M., Peleg, M., 2010. Evaluation of a stochastic inactivation model for heat-activated spores of *Bacillus* spp. *Applied Environmental Microbiology* 76, 4402-4412.
- Corry, J.E., 1974. The effect of water activity on the heat resistance of bacteria, *Water Relations of Foods. Proceedings of an International Symposium held in Glasgow*, pp. 325-337.
- Cortezzo, D.E., Koziol-Dube, K., Setlow, B., Setlow, P., 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, 838-852.
- Cortezzo, D.E., Setlow, P., 2005. Analysis of factors that influence the sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* to DNA damaging chemicals. *Journal of Applied Microbiology* 98, 606-617.
- Cowan, A.E., Koppel, D.E., Setlow, B., Setlow, P., 2003. A soluble protein is immobile in dormant spores of *Bacillus subtilis* but is mobile in germinated spores: implications for spore dormancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 4209-4214.

- Cowan, A.E., Olivastro, E.M., Koppel, D.E., Loshon, C.A., Setlow, B., Setlow, P., 2004. Lipids in the inner membrane of dormant spores of *Bacillus* species are largely immobile. Proceedings on the National Academy of Sciences U S A 101, 7733-7738.
- Crafts-Lighty, A., Ellar, D.J., 1980. The structure and function of the spore outer membrane in dormant and germinating spores of *Bacillus megaterium*. Journal of Applied Bacteriology 48, 135-143.
- Cremonesi, P., Vanoni, L., Silveti, T., Morandi, S., Brasca, M., 2012. Identification of *Clostridium beijerinckii*, *Cl. butyricum*, *Cl. sporogenes*, *Cl. tyrobutyricum* isolated from silage, raw milk and hard cheese by a multiplex PCR assay. Journal of Dairy Research 79, 318-323.
- Curran, H.R., Evans, F.R., 1945. Heat Activation Inducing Germination in the Spores of Thermotolerant and Thermophilic Aerobic Bacteria. Journal of Bacteriology 49, 335-346.
- Charney, J., Fisher, W.P., Hegarty, C.P., 1951. Manganese as an essential element for sporulation in the genus *Bacillus*. Journal of Bacteriology 62, 145.
- Checinska, A., Paszczynski, A., Burbank, M., 2015. Bacillus and other spore-forming genera: variations in responses and mechanisms for survival. Annual Reviews of Food Science Technology 6, 351-369.
- Chen, Y., Fukuoka, S., Makino, S., 2000. A novel spore peptidoglycan hydrolase of *Bacillus cereus*: biochemical characterization and nucleotide sequence of the corresponding gene, sleL. Journal of Bacteriology 182, 1499-1506.
- Chen, Y., Ray, W.K., Helm, R.F., Melville, S.B., Popham, D.L., 2014. Levels of germination proteins in *Bacillus subtilis* dormant, superdormant, and germinating spores. PLoS One 9, e95781.
- Chirakkal, H., O'Rourke, M., Atrih, A., Foster, S.J., Moir, A., 2002. Analysis of spore cortex lytic enzymes and related proteins in *Bacillus subtilis* endospore germination. Microbiology 148, 2383-2392.
- Christie, G., Setlow, P., 2020. *Bacillus* spore germination: Knowns, unknowns and what we need to learn. Cellular Signalling, 109729.
- de Sarrau, B., Clavel, T., Clerte, C., Carlin, F., Ginies, C., Nguyen-The, C., 2012. Influence of anaerobiosis and low temperature on *Bacillus cereus* growth, metabolism, and membrane properties. Applied and Environmental Microbiology 78, 1715-1723.
- De Vries, Y.P., Atmadja, R.D., Hornstra, L.M., de Vos, W.M., Abee, T., 2005. Influence of glutamate on growth, sporulation, and spore properties of *Bacillus cereus* ATCC 14579 in defined medium. Applied and Environmental Microbiology 71, 3248-3254.
- Douki, T., Setlow, B., Setlow, P., 2005. Photosensitization of DNA by dipicolinic acid, a major component of spores of *Bacillus* species. Photochemistry Photobiology Sci 4, 591-597.
- Driks, A., 2002. Proteins of the spore core and coat, *Bacillus subtilis* and its closest relatives. American Society of Microbiology, pp. 527-535.
- EFSA, 2005a. Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp in foodstuffs. EFSA Journal 3, 175.
- EFSA, 2005b. Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) related to *Clostridium* spp in foodstuffs. EFSA Journal 3, 199.
- Esty, J., Meyer, K., 1922. The heat resistance of the spores of *B. botulinum* and allied anaerobes. XI. The Journal of Infectious Diseases, 650-663.

- Fan, L., Ismail, B.B., Hou, F., Muhammad, A.I., Zou, M., Ding, T., Liu, D., 2019. Thermosonication damages the inner membrane of *Bacillus subtilis* spores and impels their inactivation. *Food Research International*, 108514.
- Feeherry, F.E., Munsey, D.T., Rowley, D.B., 1987. Thermal inactivation and injury of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 365-370.
- Fernández, P.S., Peck, M.W., 1999. A predictive model that describes the effect of prolonged heating at 70 to 90 C and subsequent incubation at refrigeration temperatures on growth from spores and toxigenesis by nonproteolytic *Clostridium botulinum* in the presence of lysozyme. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3449-3457.
- Foegeding, P.M., Busta, F.F., 1981. Bacterial spore injury—an update. *Journal of food protection* 44, 776-786.
- Foster, J., Hardwick, W., Guirard, B., 1950. ANTISPORULATION FACTORS IN COMPLEX ORGANIC MEDIA I: Growth and Sporulation Studies on *Bacillus larvae* 1, 2, 3. *Journal of Bacteriology* 59, 463.
- Foster, J.W., Heiligman, F., 1949. Mineral deficiencies in complex organic media as limiting factors in the sporulation of aerobic Bacilli. *Journal of Bacteriology* 57, 613.
- Foster, S.J., Johnstone, K., 1986. The use of inhibitors to identify early events during *Bacillus megaterium* KM spore germination. *Biochemical Journal* 237, 865-870.
- Foster, S.J., Popham, D.L., 2002. Structure and synthesis of cell wall, spore cortex, teichoic acids, S-layers, and capsules, *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives. *American Society of Microbiology*, pp. 21-41.
- Frandsen, N., Barak, I., Karmazyn-Campelli, C., Stragier, P., 1999. Transient gene asymmetry during sporulation and establishment of cell specificity in *Bacillus subtilis*. *Genes & Development* 13, 394-399.
- Frentz, Z., Dworkin, J., 2020. Bioluminescence dynamics in single germinating bacterial spores reveal metabolic heterogeneity. *Journal of the Royal Society Interface* 17, 20200350.
- Geeraerd, A.H., Herremans, C.H., Van Impe, J.F., 2000. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology* 59, 185-209.
- Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P., Van Impe, J.F., 2005. GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology* 102, 95-105.
- Georget, E., Miller, B., Aganovic, K., Callanan, M., Heinz, V., Mathys, A., 2014. Bacterial spore inactivation by ultra-high pressure homogenization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 26, 116-123.
- Gerhardt, P., 1989. Spore thermoresistance mechanisms. *American Society for Microbiology*, Washington, DC.
- Gerhardt, P., Beaman, T.C., Corner, T.R., Greenamyre, J.T., Tisa, L.S., 1982. Photometric immersion refractometry of bacterial spores. *Journal of Bacteriology* 150, 643-648.
- Gerhardt, P., Marquis, R.E., 1989. Spore thermoresistance mechanisms. *Regulation of Prokaryotic Development*. Ed Smith, I., Slepecky, R. and Setlow, P. *American Society for Microbiology*, Washington, D.C., pp. 17-63.

- Ghosh, S., Ramirez-Peralta, A., Gaidamakova, E., Zhang, P., Li, Y.Q., Daly, M.J., Setlow, P., 2011. Effects of Mn levels on resistance of *Bacillus megaterium* spores to heat, radiation and hydrogen peroxide. *Journal of Applied Microbiology* 111, 663-670.
- Ghosh, S., Setlow, B., Wahome, P.G., Cowan, A.E., Plomp, M., Malkin, A.J., Setlow, P., 2008. Characterization of spores of *Bacillus subtilis* that lack most coat layers. *Journal of Bacteriology* 190, 6741-6748.
- Ghosh, S., Setlow, P., 2009. Isolation and characterization of superdormant spores of *Bacillus* species. *Journal of Bacteriology* 191, 1787-1797.
- Ghosh, S., Setlow, P., 2010. The preparation, germination properties and stability of superdormant spores of *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology* 108, 582-590.
- Ghosh, S., Zhang, P., Li, Y., Setlow, P., 2009. Superdormant spores of *Bacillus* species have elevated wet-heat resistance and temperature requirements for heat activation. *Journal of Bacteriology* 191, 5584-5591.
- Gil, I., 2017. Fisiología de la termorresistencia de los esporos bacterianos. Trabajo de Fin de Grado.
- González-Pastor, J.E., 2011. Cannibalism: a social behavior in sporulating *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews* 35, 415-424.
- González-Pastor, J.E., Hobbs, E.C., Losick, R., 2003. Cannibalism by sporulating bacteria. *Science* 301, 510-513.
- Gould, G., 2006. History of science—spores: Lewis B Perry Memorial lecture 2005. *Journal of Applied Microbiology* 101, 507-513.
- Gould, G.W., Dring, G.J., 1975. Heat resistance of bacterial endospores and concept of an expanded osmoregulatory cortex. *Nature* 258, 402-405.
- Gould, G.W., Sale, A.J., 1970. Initiation of germination of bacterial spores by hydrostatic pressure. *Journal of General Microbiology* 60, 335-346.
- Gounina-Allouane, R., Broussolle, V., Carlin, F., 2008. Influence of the sporulation temperature on the impact of the nutrients inosine and l-alanine on *Bacillus cereus* spore germination. *Food Microbiology* 25, 202-206.
- Griffiths, K.K., Setlow, P., 2009. Effects of modification of membrane lipid composition on *Bacillus subtilis* sporulation and spore properties. *Journal of Applied Microbiology* 106, 2064-2078.
- Griffiths, K.K., Zhang, J., Cowan, A.E., Yu, J., Setlow, P., 2011. Germination proteins in the inner membrane of dormant *Bacillus subtilis* spores colocalize in a discrete cluster. *Molecular Microbiology* 81, 1061-1077.
- Griffiths, M., Schraft, H., 2017. *Bacillus cereus* food poisoning, *Foodborne Diseases*. Elsevier, pp. 395-405.
- Guerrero-Beltrán, J., Barbosa-Cánovas, G., 2004. Advantages and limitations on processing foods by UV light. *Food Science and Technology International* 10, 137-147.
- Guidi-Rontani, C., Levy, M., Ohayon, H., Mock, M., 2001. Fate of germinated *Bacillus anthracis* spores in primary murine macrophages. *Molecular Microbiology* 42, 931-938.
- Hamilton, W.A., Sale, A.J.H., 1967. Effects of high electric fields on microorganisms: II. Mechanism of action of the lethal effect. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 148, 789-800.

- Hashimoto, T., Conti, S.F., 1971. Ultrastructural changes associated with activation and germination of *Bacillus cereus* T spores. *Journal of Bacteriology* 105, 361-368.
- Henriques, A.O., Moran, C.P., Jr., 2000. Structure and assembly of the bacterial endospore coat. *Methods* 20, 95-110.
- Hofstetter, S., Denter, C., Winter, R., McMullen, L.M., Ganzle, M.G., 2012. Use of the fluorescent probe LAURDAN to label and measure inner membrane fluidity of endospores of *Clostridium* spp. *Journal of Microbiological Methods* 91, 93-100.
- Hudson, K.D., Corfe, B.M., Kemp, E.H., Feavers, I.M., Coote, P.J., Moir, A., 2001. Localization of GerAA and GerAC germination proteins in the *Bacillus subtilis* spore. *Journal of Bacteriology* 183, 4317-4322.
- Huesca-Espitia, L.C., Suvira, M., Rosenbeck, K., Korza, G., Setlow, B., Li, W., Wang, S., Li, Y.Q., Setlow, P., 2016. Effects of steam autoclave treatment on *Geobacillus stearothermophilus* spores. *Journal of Applied Microbiology* 121, 1300-1311.
- Iciek, J., Papiewska, A., Nowicki, L., 2000. Kinetics of activation and destruction of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Progress in Biotechnology. Food Biotechnology*, Elsevier. Amsterdam, 17, 385-392.
- Imae, Y., Strominger, J.L., 1976. Relationship between cortex content and properties of *Bacillus sphaericus* spores. *Journal of Bacteriology* 126, 907-913.
- Imšenecki, A., Solnzeva, L., 1945. The growth of aerobic thermophilic bacteria. *Journal of Bacteriology* 49, 539.
- Ingraham, J.L., Painter, P.R., Stainer, R.Y., Wheelis, M.L., 1992. *Microbiología*, 2ª ed, Barcelona.
- Ishikawa, S., Yamane, K., Sekiguchi, J., 1998. Regulation and characterization of a newly deduced cell wall hydrolase gene (cwlJ) which affects germination of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology* 180, 1375-1380.
- Jay, J.M., 1992. High-temperature food preservation and characteristics of thermophilic microorganisms, *Modern Food Microbiology*. Springer, pp. 335-355.
- Jedrzejewski, M.J., Chander, M., Setlow, P., Krishnasamy, G., 2000a. Mechanism of catalysis of the cofactor-independent phosphoglycerate mutase from *Bacillus stearothermophilus*. Crystal structure of the complex with 2-phosphoglycerate. *Journal of Biological Chemistry* 275, 23146-23153.
- Jedrzejewski, M.J., Chander, M., Setlow, P., Krishnasamy, G., 2000b. Structure and mechanism of action of a novel phosphoglycerate mutase from *Bacillus stearothermophilus*. *EMBO Journal* 19, 1419-1431.
- Johnson, L.D., 2010. *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 11th Edition ed. Life Technologies Corporation.
- Katsui, N., Tsuchido, T., Takano, M., Shibasaki, I., 1982. Viability of heat-stressed cells of microorganisms as influenced by pre-incubation and post-incubation temperatures. *Journal of Applied Bacteriology* 53, 103-108.
- Keynan, A., Evanchik, Z., Halvorson, H.O., Hastings, J.W., 1964. Activation of Bacterial Endospores. *Journal of Bacteriology* 88, 313-318.

- Klobutcher, L.A., Ragkousi, K., Setlow, P., 2006. The *Bacillus subtilis* spore coat provides “eat resistance” during phagocytic predation by the protozoan *Tetrahymena thermophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 165-170.
- Knorr, D., Geulen, M., Grahl, T., Sitzmann, W., 1994. Food application of high electric field pulses. *Trends in Food Science & Technology* 5, 71-75.
- Koch, A., 1888. Ueber Morphologie und Entwicklungsgeschichte einiger endosporer Bakterienformen. Verlag nicht ermittelbar.
- Kohler, L.J., Quirk, A.V., Welkos, S.L., Cote, C.K., 2018. Incorporating germination-induction into decontamination strategies for bacterial spores. *Journal of Applied Microbiology* 124, 2-14.
- Kort, R., O'Brien, A.C., van Stokkum, I.H., Oomes, S.J., Crielaard, W., Hellingwerf, K.J., Brul, S., 2005. Assessment of heat resistance of bacterial spores from food product isolates by fluorescence monitoring of dipicolinic acid release. *Applied Environmental Microbiology* 71, 3556-3564.
- Korza, G., Setlow, B., Rao, L., Li, Q., Setlow, P., 2016. Changes in *Bacillus* spore small molecules, rRNA, germination, and outgrowth after extended sublethal exposure to various temperatures: evidence that protein synthesis is not essential for spore germination. *Journal of Bacteriology* 198, 3254-3264.
- Krawczyk, A.O., Berendsen, E.M., de Jong, A., Boekhorst, J., Wells-Bennik, M.H.J., Kuipers, O.P., Eijlander, R.T., 2016. A transposon present in specific strains of *Bacillus subtilis* negatively affects nutrient-and dodecylamine-induced spore germination. *Environmental Microbiology* 18, 4830-4846.
- Kumari, S., Sarkar, P.K., 2016. *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. *Food Control* 69, 20-29.
- Laflamme, C., Lavigne, S., Ho, J., Duchaine, C., 2004. Assessment of bacterial endospore viability with fluorescent dyes. *Journal of Applied Microbiology* 96, 684-692.
- Lai, E.M., Phadke, N.D., Kachman, M.T., Giorno, R., Vazquez, S., Vazquez, J.A., Maddock, J.R., Driks, A., 2003. Proteomic analysis of the spore coats of *Bacillus subtilis* and *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* 185, 1443-1454.
- Leggett, M.J., McDonnell, G., Denyer, S.P., Setlow, P., Maillard, J.Y., 2012. Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. *Journal of Applied Microbiology* 113, 485-498.
- Leguérinel, I., Mafart, P., 2001. Modelling the influence of pH and organic acid types on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Microbiology* 63, 29-34.
- Leighton, T.J., Doi, R.H., 1971. The stability of messenger ribonucleic acid during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry* 246, 3189-3195.
- Lelieveld, H.L.M., Notermans, S., De Haan, S.W.H. (Eds), 2007. Food preservation by pulsed electric fields: from research to application. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
- Lequette, Y., Garénaux, E., Tauveron, G., Dumez, S., Perchat, S., Slomianny, C., Lereclus, D., Guérardel, Y., Faille, C., 2011. Role played by exosporium glycoproteins in the surface properties of *Bacillus cereus* spores and in their adhesion to stainless steel. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 4905-4911.
- Lewis, J.C., Snell, N.S., Alderton, G., 1965. Dormancy and activation of bacterial spores. *Spores III*, pp. 47-54.

- Lewis, J.C., Snell, N.S., Burr, H.K., 1960. Water Permeability of Bacterial Spores and the Concept of a Contractile Cortex. *Science* 132, 544-545.
- Li, Y., Jin, K., Setlow, B., Setlow, P., Hao, B., 2012. Crystal structure of the catalytic domain of the *Bacillus cereus* SleB protein, important in cortex peptidoglycan degradation during spore germination. *Journal of Bacteriology* 194, 4537-4545.
- Lindström, M., Myllykoski, J., Sivelä, S., Korkeala, H., 2010. *Clostridium botulinum* in cattle and dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 50, 281-304.
- Logan, N.A., 2012. *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *Journal of Applied Microbiology* 112, 417-429.
- Loison, P., Gervais, P., Perrier-Cornet, J.M., Kuimova, M.K., 2016. Effect of ethanol perturbation on viscosity and permeability of an inner membrane in *Bacillus subtilis* spores. *Biochimica et Biophysica Acta* 1858, 2060-2069.
- Loison, P., Hosny, N.A., Gervais, P., Champion, D., Kuimova, M.K., Perrier-Cornet, J.M., 2013. Direct investigation of viscosity of an atypical inner membrane of *Bacillus* spores: a molecular rotor/FLIM study. *Biochimica et Biophysica Acta* 1828, 2436-2443.
- Long, S.K., Williams, O.B., 1960. Factors Affecting Growth and Spore Formation of *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Bacteriology* 79, 625-628.
- López, M., González, I., Mazas, M., González, J., Martín, R., Bernardo, A., 1997. Influence of recovery conditions on apparent heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *International Journal of Food Science & Technology* 32, 305-311.
- Losick, R., 2010. Developmental biology of a simple organism. *Spore Formation in B. Subtilis*, iBioSeminars ed.
- Luu, S., Setlow, P., 2014. Analysis of the loss in heat and acid resistance during germination of spores of *Bacillus* species. *Journal of Bacteriology* 196, 1733-1740.
- Mackey, B., 2000. Injured bacteria. *The microbiological safety and quality of food* 1, 315-341.
- Magge, A., Granger, A.C., Wahome, P.G., Setlow, B., Vepachedu, V.R., Loshon, C.A., Peng, L., Chen, D., Li, Y.Q., Setlow, P., 2008. Role of dipicolinic acid in the germination, stability, and viability of spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 190, 4798-4807.
- Magill, N.G., Cowan, A.E., Leyva-Vazquez, M.A., Brown, M., Koppel, D.E., Setlow, P., 1996. Analysis of the relationship between the decrease in pH and accumulation of 3-phosphoglyceric acid in developing forespores of *Bacillus* species. *Journal of Bacteriology* 178, 2204-2210.
- Makki, F., Durance, T., 1996. Thermal inactivation of lysozyme as influenced by pH, sucrose and sodium chloride and inactivation and preservative effect in beer. *Food Research International* 29, 635-645.
- Mallidis, C., Frantzeskakis, P., Balatsouras, G., Katsaboxakis, C., 1990. Thermal treatment of aseptically processed tomato paste. *International Journal of Food Science & Technology* 25, 442-448.
- Mañas, P., Pagán, R., 2005. Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology* 98, 1387-1399.
- Marcén, M., 2018. Influencia del estrés oxidativo en la inactivación bacteriana por diferentes tecnologías utilizadas para la conservación de los alimentos. Universidad de Zaragoza.

- Marcén, M., Ruiz, V., Serrano, M.J., Condón, S., Mañas, P., 2017. Oxidative stress in *E. coli* cells upon exposure to heat treatments. *International Journal of Food Microbiology* 241, 198-205.
- Márquez, V.O., Mittal, G.S., Griffiths, M.W., 1997. Destruction and inhibition of bacterial spores by high voltage pulsed electric field. *Journal of Food Science* 62, 399-&.
- Mathys, A., Chapman, B., Bull, M., Heinz, V., Knorr, D., 2007. Flow cytometric assessment of *Bacillus* spore response to high pressure and heat. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 8, 519-527.
- McKenney, P.T., Driks, A., Eichenberger, P., 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology* 11, 33-44.
- McPherson, D.C., Kim, H., Hahn, M., Wang, R., Grabowski, P., Eichenberger, P., Driks, A., 2005. Characterization of the *Bacillus subtilis* spore morphogenetic coat protein CotO. *Journal of Bacteriology* 187, 8278-8290.
- Melly, E., Genest, P.C., Gilmore, M.E., Little, S., Popham, D.L., Driks, A., Setlow, P., 2002. Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures. *Journal of Applied Microbiology* 92, 1105-1115.
- Melly, E., Setlow, P., 2001. Heat shock proteins do not influence wet heat resistance of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology* 183, 779-784.
- Minh, H.N.T., Durand, A., Loison, P., Perrier-Cornet, J.M., Gervais, P., 2011. Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90, 1409-1417.
- Minh, H.N.T., Perrier-Cornet, J.-M., Gervais, P., 2008. Effect of the osmotic conditions during sporulation on the subsequent resistance of bacterial spores. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80, 107.
- Moir, A., 1981. Germination properties of a spore coat-defective mutant of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 146, 1106-1116.
- Moir, A., Cooper, G., 2015. Spore Germination. *Microbiology Spectrum* 3. Doi: 10.1128/microbiolspec.TBS-0014-2012. PMID: 27337279.
- Moir, A., Smith, D.A., 1990. The genetics of bacterial spore germination. *Annual Reviews on Microbiology* 44, 531-553.
- Molin, N., Snygg, B.G., 1967. Effect of lipid materials on heat resistance of bacterial spores. *Applied Microbiology* 15, 1422-1426.
- Movahedi, S., Waites, W., 2000. A two-dimensional protein gel electrophoresis study of the heat stress response of *Bacillus subtilis* cells during sporulation. *Journal of Bacteriology* 182, 4758-4763.
- Murray, T., Popham, D.L., Pearson, C.B., Hand, A.R., Setlow, P., 1998. Analysis of outgrowth of *Bacillus subtilis* spores lacking penicillin-binding protein 2a. *Journal of Bacteriology* 180, 6493-6502.
- Murrell, W., Scott, W., 1966. The heat resistance of bacterial spores at various water activities. *Microbiology* 43, 411-425.
- Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., Setlow, P., 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 548-572.

- Okazaki, T., Kakugawa, K., Yoneda, T., Suzuki, K., 2000. Inactivation behaviour of heat-resistant bacterial spores by thermal treatments combined with high hydrostatic pressure. *Food Science and Technology Research* 6, 204-207.
- Paidhungat, M., Ragkousi, K., Setlow, P., 2001. Genetic requirements for induction of germination of spores of *Bacillus subtilis* by Ca²⁺-dipicolinate. *Journal of Bacteriology* 183, 4886-4893.
- Paidhungat, M., Setlow, B., Daniels, W.B., Hoover, D., Papafragkou, E., Setlow, P., 2002. Mechanisms of induction of germination of *Bacillus subtilis* spores by high pressure. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3172-3175.
- Paidhungat, M., Setlow, B., Driks, A., Setlow, P., 2000. Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolinic acid. *Journal of Bacteriology* 182, 5505-5512.
- Paidhungat, M., Setlow, P., 2002. Spore Germination and Outgrowth, *Bacillus subtilis* and its Closest Relatives. *American Society of Microbiology*, pp. 537-548.
- Palop, A., Mañas, P., Condón, S., 1999. Sporulation temperature and heat resistance of *Bacillus* spores: A review. *Journal of Food Safety* 19, 57-72.
- Palop, A., Raso, J., Pagán, R., Condón, S., Sala, F.J., 1999. Influence of pH on heat resistance of spores of *Bacillus coagulans* in buffer and homogenized foods. *International Journal of Food Microbiology* 46, 243-249.
- Paredes-Sabja, D., Setlow, P., Sarker, M.R., 2009. SleC is essential for cortex peptidoglycan hydrolysis during germination of spores of the pathogenic bacterium *Clostridium perfringens*. *Journal of Bacteriology* 191, 2711-2720.
- Paredes-Sabja, D., Setlow, P., Sarker, M.R., 2011. Germination of spores of Bacillales and Clostridiales species: mechanisms and proteins involved. *Trends in Microbiology* 19, 85-94.
- Peck, M.W., 2010. *Clostridium botulinum*, Pathogens and Toxins in Foods. *American Society of Microbiology*, pp. 31-52.
- Peck, M.W., Fairbairn, D.A., Lund, B.M., 1992. Factors affecting growth from heat-treated spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum*. *Letters in Applied Microbiology* 15, 152-155.
- Peck, M.W., Stringer, S.C., 2005. The safety of pasteurised in-pack chilled meat products with respect to the foodborne botulism hazard. *Meat Science* 70, 461-475.
- Pelczar, P.L., Igarashi, T., Setlow, B., Setlow, P., 2007. Role of GerD in germination of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology* 189, 1090-1098.
- Peleg, M., 2002. A model of survival curves having an 'activation shoulder'. *Journal of Food Science* 67, 2438-2443.
- Peleg, M., 2006. *Advanced quantitative microbiology for foods and biosystems: models for predicting growth and inactivation*. CRC Press.
- Perez-Valdespino, A., Li, Y., Setlow, B., Ghosh, S., Pan, D., Korza, G., Feeherry, F.E., Doona, C.J., Li, Y.Q., Hao, B., Setlow, P., 2014. Function of the SpoVAEa and SpoVAF proteins of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology* 196, 2077-2088.
- Periago, P.M., Fernandez, P.S., Ocio, M.J., Martínez, A., 1998. A predictive model to describe sensitization of heat-treated *Bacillus stearothermophilus* spores to NaCl. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A* 206, 58-62.

- Piggot, P.J., Losick, R., 2002. Sporulation genes and intercompartmental regulation, *Bacillus subtilis* and its Closest Relatives. American Society of Microbiology, pp. 483-517.
- Pillet, F., Formosa-Dague, C., Baaziz, H., Dague, E., Rols, M.P., 2016. Cell wall as a target for bacteria inactivation by pulsed electric fields. Scientific Reports 6, 19778.
- Planchon, S., Dargaignaratz, C., Levy, C., Ginies, C., Broussolle, V., Carlin, F., 2011. Spores of *Bacillus cereus* strain KBAB4 produced at 10 degrees C and 30 degrees C display variations in their properties. Food Microbiology 28, 291-297.
- Pol, I.E., van Arendonk, W.G., Mastwijk, H.C., Krommer, J., Smid, E.J., Moezelaar, R., 2001. Sensitivities of germinating spores and carvacrol-adapted vegetative cells and spores of *Bacillus cereus* to nisin and pulsed-electric-field treatment. Applied and Environmental Microbiology 67, 1693-1699.
- Popham, D.L., 2002. Specialized peptidoglycan of the bacterial endospore: the inner wall of the lockbox. Cellular and Molecular Life Science 59, 426-433.
- Popham, D.L., Bernhards, C.B., 2015. Spore Peptidoglycan. Microbiology Spectrum 3.
- Popham, D.L., Helin, J., Costello, C.E., Setlow, P., 1996. Muramic lactam in peptidoglycan of *Bacillus subtilis* spores is required for spore outgrowth but not for spore dehydration or heat resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences 93, 15405-15410.
- Popham, D.L., Setlow, P., 1993. The cortical peptidoglycan from spores of *Bacillus megaterium* and *Bacillus subtilis* is not highly cross-linked. Journal of Bacteriology 175, 2767-2769.
- Postollec, F., Mathot, A.G., Bernard, M., Divanac'h, M.L., Pavan, S., Sohier, D., 2012. Tracking spore-forming bacteria in food: from natural biodiversity to selection by processes. International Journal of Food Microbiology 158, 1-8.
- Prentice, G.A., Clegg, L.F., 1974. The effect of incubation temperature on the recovery of spores of *Bacillus subtilis* 8057. Journal of Applied Bacteriology 37, 501-513.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D., 2013. The complex microbiota of raw milk. FEMS Microbiology Reviews 37, 664-698.
- Ragkousi, K., Eichenberger, P., van Ooij, C., Setlow, P., 2003. Identification of a new gene essential for germination of *Bacillus subtilis* spores with Ca²⁺-dipicolinate. Journal of Bacteriology 185, 2315-2329.
- Ramirez-Peralta, A., Zhang, P., Li, Y.Q., Setlow, P., 2012. Effects of sporulation conditions on the germination and germination protein levels of *Bacillus subtilis* spores. Applied and Environmental Microbiology 78, 2689-2697.
- Rao, L., Liao, X., Setlow, P., 2016. *Bacillus* spore wet heat resistance and evidence for the role of an expanded osmoregulatory spore cortex. Letters in Applied Microbiology 63, 247-253.
- Rao, L., Wang, Y.T., Chen, F., Hu, X.S., Liao, X.J., Zhao, L., 2020. High pressure CO₂ reduces the wet heat resistance of *Bacillus subtilis* spores by perturbing the inner membrane. Innovative Food Science & Emerging Technologies 60, 102291.
- Raso, J., Condón, S., Álvarez, I., 2014. Non-thermal processing| pulsed electric field, in: Batt, C.A. (Ed.), Encyclopedia of Food Microbiology, second ed. ed. Elsevier, pp. 966-973.
- Raso, J., Pagán, R., Condón, S., Sala, F.J., 1998. Influence of temperature and pressure on the lethality of ultrasound. Applied Environmental Microbiology 64, 465-471.

- Redmond, C., Baillie, L.W., Hibbs, S., Moir, A.J., Moir, A., 2004. Identification of proteins in the exosporium of *Bacillus anthracis*. *Microbiology* 150, 355-363.
- Reineke, K., Ellinger, N., Berger, D., Baier, D., Mathys, A., Setlow, P., Knorr, D., 2013. Structural analysis of high pressure treated *Bacillus subtilis* spores. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 17, 43-53.
- Reineke, K., Mathys, A., 2020. Endospore Inactivation by Emerging Technologies: A Review of Target Structures and Inactivation Mechanisms. *Annual Review of Food Science Technology* 11, 255-274.
- Reineke, K., Schottroff, F., Meneses, N., Knorr, D., 2015. Sterilization of liquid foods by pulsed electric fields—an innovative ultra-high temperature process. *Frontiers in Microbiology* 6, 400.
- Reyes, A.T., Ambita, D., Batalon, J.L., Aba, B.L., Cortes, A., Macabecha, C.G., Montecillo, A., 2019. Release of dipicolinic acid from spores of *Geobacillus stearothermophilus*. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* 9, 22-25.
- Riemann, H., Ordal, Z.J., 1961. Germination of bacterial endospores with calcium and dipicolinic acid. *Science* 133, 1703-1704.
- Riesenman, P.J., Nicholson, W.L., 2000. Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 620-626.
- Rode, L.J., Foster, J.W., 1961. Germination of bacterial spores with alkyl primary amines. *Journal of Bacteriology* 81, 768-779.
- Rode, L.J., Foster, J.W., 1966. Influence of exchangeable ions on germinability of bacterial spores. *Journal of Bacteriology* 91, 1582-1588.
- Rodriguez, A., Smerage, G., Teixeira, A., Busta, F., 1991. Kinetic effects of lethal temperatures on population dynamics of bacterial spores. *Transactions of the ASAE* 31, 1594-1601.
- Rose, R., Setlow, B., Monroe, A., Mallozzi, M., Driks, A., Setlow, P. 2007. Comparison of the properties of *Bacillus subtilis* spores made in liquid or on agar plates. *Journal of Applied Microbiology* 103, 691-699.
- Rowe, J.J., Goldberg, I.D., Amelunxen, R.E., 1975. Development of defined and minimal media for the growth of *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Bacteriology* 124, 279-284.
- Sanchez-Salas, J.L., Setlow, B., Zhang, P.F., Li, Y.Q., Setlow, P., 2011. Maturation of Released Spores Is Necessary for Acquisition of Full Spore Heat Resistance during *Bacillus subtilis* Sporulation. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 6746-6754.
- Sang-Wook, L., Sang Jun, S., 2006. Increased heat resistance of *Geobacillus stearothermophilus* spores heat-shocked during sporulation. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 16, 633-636.
- Sapru, V., Labuza, T.P., 1993. Glassy state in bacterial spores predicted by polymer glass-transition theory. *Journal of Food Science* 58, 445-448.
- Sapru, V., Teixeira, A.A., Smerage, G.H., Lindsay, J.A., 1992. Predicting thermophilic spore population dynamics for UHT sterilization processes. *Journal of Food Science* 57, 1248-1257.
- Sarker, M.R., Akhtar, S., Torres, J.A., Paredes-Sabja, D., 2015. High hydrostatic pressure-induced inactivation of bacterial spores. *Critical Reviews in Microbiology* 41, 18-26.

- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J.A., Charlier, P., 2008. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 234-258.
- Segev, E., Rosenberg, A., Mamou, G., Sinai, L., Ben-Yehuda, S., 2013. Molecular kinetics of reviving bacterial spores. *Journal of Bacteriology* 195, 1875-1882.
- Setlow, B., Cowan, A.E., Setlow, P., 2003. Germination of spores of *Bacillus subtilis* with dodecylamine. *Journal of Applied Microbiology* 95, 637-648.
- Setlow, B., Loshon, C.A., Genest, P.C., Cowan, A.E., Setlow, C., Setlow, P., 2002. Mechanisms of killing spores of *Bacillus subtilis* by acid, alkali and ethanol. *Journal of Applied Microbiology* 92, 362-375.
- Setlow, B., McGinnis, K.A., Ragkousi, K., Setlow, P., 2000. Effects of major spore-specific DNA binding proteins on *Bacillus subtilis* sporulation and spore properties. *Journal of Bacteriology* 182, 6906-6912.
- Setlow, B., Melly, E., Setlow, P., 2001. Properties of spores of *Bacillus subtilis* blocked at an intermediate stage in spore germination. *Journal of Bacteriology* 183, 4894-4899.
- Setlow, B., Peng, L., Loshon, C.A., Li, Y.Q., Christie, G., Setlow, P., 2009. Characterization of the germination of *Bacillus megaterium* spores lacking enzymes that degrade the spore cortex. *Journal of Applied Microbiology* 107, 318-328.
- Setlow, B., Setlow, P., 1998. Heat killing of *Bacillus subtilis* spores in water is not due to oxidative damage. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4109-4112.
- Setlow, B., Wahome, P.G., Setlow, P., 2008. Release of small molecules during germination of spores of *Bacillus* Species. *Journal of Bacteriology* 190, 4759-4763.
- Setlow, P., 1988. Small, acid-soluble spore proteins of *Bacillus* species: structure, synthesis, genetics, function, and degradation. *Annual Review of Microbiology* 42, 319-338.
- Setlow, P., 1995. Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spores of *Bacillus* species. *Annual Review of Microbiology* 49, 29-54.
- Setlow, P., 2001. Resistance of spores of *Bacillus* species to ultraviolet light. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 38, 97-104.
- Setlow, P., 2003. Spore germination. *Current Opinion in Microbiology* 6, 550-556.
- Setlow, P., 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology* 101, 514-525.
- Setlow, P., 2007. I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends in Microbiology* 15, 172-180.
- Setlow, P., 2011. Resistance of bacterial spores, *Bacterial Stress Responses*, Second Edition. American Society of Microbiology, pp. 319-332.
- Setlow, P., 2013. Summer meeting 2013—when the sleepers wake: the germination of spores of *Bacillus* species. *Journal of Applied Microbiology* 115, 1251-1268.
- Setlow, P., 2014. Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know. *Journal of Bacteriology* 196, 1297-1305.
- Setlow, P., 2016. Spore resistance properties, *The bacterial spore: from molecules to systems*. American Society of Microbiology, pp. 201-215.

- Setlow, P., Johnson, E.A., 2019. Spores and their significance. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 23-63.
- Setlow, P., Li, L., 2015. Photochemistry and Photobiology of the Spore Photoproduct: A 50-Year Journey. *Photochemistry and Photobiology* 91, 1263-1290.
- Setlow, P., Liu, J.T., Faeder, J.R., 2012. Heterogeneity in Bacterial Spore Populations, in: Abel-Santos, E. (Ed.), *Bacterial spores: current research and applications*. Caister Academic Press, U.K., pp. 199-214.
- Setlow, P., Wang, S., Li, Y.Q., 2017. Germination of Spores of the Orders Bacillales and Clostridiales. *Annual Reviews of Microbiology* 71, 459-477.
- Sevenich, R., Mathys, A., 2018. Continuous Versus Discontinuous Ultra-High-Pressure Systems for Food Sterilization with Focus on Ultra-High-Pressure Homogenization and High-Pressure Thermal Sterilization: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 17, 646-662.
- Shah, I.M., Laaberki, M.H., Popham, D.L., Dworkin, J., 2008. A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments. *Cell* 135, 486-496.
- Shin, J.K., Lee, S.J., Cho, H.Y., Pyun, Y.R., Lee, J.H., Chung, M.S., 2010. Germination and Subsequent Inactivation of *Bacillus subtilis* Spores by Pulsed Electric Field Treatment. *Journal of Food Processing and Preservation* 34, 43-54.
- Siemer, C., Toepfl, S., Heinz, V., 2014. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by pulsed electric fields (PEF) in combination with thermal energy—I. Influence of process-and product parameters. *Food Control* 39, 163-171.
- Sinai, L., Ben-Yehuda, S., 2016. Commentary: Changes in *Bacillus* spore small molecules, rRNA, germination, and outgrowth after extended sublethal exposure to various temperatures: Evidence that protein synthesis is not essential for spore germination. *Frontiers in Microbiology* 7, 2043.
- Sinai, L., Rosenberg, A., Smith, Y., Segev, E., Ben-Yehuda, S., 2015. The molecular timeline of a reviving bacterial spore. *Molecular Cell* 57, 695-707.
- Slieman, T.A., Nicholson, W.L., 2001. Role of Dipicolinic Acid in Survival of *Bacillus subtilis* Spores Exposed to Artificial and Solar UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 1274-1279.
- Smerilli, M., Neureiter, M., Wurz, S., Haas, C., Fruhauf, S., Fuchs, W., 2015. Direct fermentation of potato starch and potato residues to lactic acid by *Geobacillus stearothermophilus* under non-sterile conditions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 90, 648-657.
- Soni, A., Oey, I., Silcock, P., Bremer, P., 2016. *Bacillus* Spores in the Food Industry: A Review on Resistance and Response to Novel Inactivation Technologies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15, 1139-1148.
- Soni, A., Oey, I., Silcock, P., Ross, I.K., Bremer, P.J., 2020. Effect of pulsed electric field with moderate heat (80° C) on inactivation, thermal resistance and differential gene expression in *B. cereus* spores. *Journal of Food Processing and Preservation* 44, e14503.
- Steichen, C.T., Kearney, J.F., Turnbough Jr, C.L., 2007. Non-uniform assembly of the *Bacillus anthracis* exosporium and a bottle cap model for spore germination and outgrowth. *Molecular Microbiology* 64, 359-367.
- Stewart, G.C., 2015. The Exosporium Layer of Bacterial Spores: a Connection to the Environment and the Infected Host. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 79, 437-457.

- Stewart, K.A., Setlow, P., 2013. Numbers of individual nutrient germinant receptors and other germination proteins in spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 195, 3575-3582.
- Stoeckel, M., Westermann, A.C., Atamer, Z., Hinrichs, J., 2013. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores in infant formula under shear conditions. *Dairy Science & Technology* 93, 163-175.
- Strauch, M.A., de Mendoza, D., Hoch, J.A., 1992. cis-unsaturated fatty acids specifically inhibit a signal-transducing protein kinase required for initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 6, 2909-2917.
- Syamaladevi, R.M., Tang, J., Villa-Rojas, R., Sablani, S., Carter, B., Campbell, G., 2016. Influence of water activity on thermal resistance of microorganisms in low-moisture foods: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15, 353-370.
- Takamatsu, H., Watabe, K., 2002. Assembly and genetics of spore protective structures. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59, 434-444.
- Tan, I.S., Ramamurthi, K.S., 2014. Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environmental Microbiology Reports* 6, 212-225.
- Tehri, N., Kumar, N., Raghu, H.V., Vashishth, A., 2018. Biomarkers of bacterial spore germination. *Annals of Microbiology* 68, 513-523.
- Tennen, R., Setlow, B., Davis, K.L., Loshon, C.A., Setlow, P., 2000. Mechanisms of killing of spores of *Bacillus subtilis* by iodine, glutaraldehyde and nitrous acid. *Journal of Applied Microbiology* 89, 330-338.
- Thompson, P.J., Thames, O.A., 1967. Sporulation of *Bacillus stearothermophilus*. *Applied Microbiology* 15, 975-979.
- Tocheva, E.I., Matson, E.G., Morris, D.M., Moussavi, F., Leadbetter, J.R., Jensen, G.J., 2011. Peptidoglycan remodeling and conversion of an inner membrane into an outer membrane during sporulation. *Cell* 146, 799-812.
- Velásquez, J., Schuurman-Wolters, G., Birkner, J.P., Abee, T., Poolman, B., 2014. *Bacillus subtilis* spore protein SpoVAC functions as a mechanosensitive channel. *Molecular Microbiology* 92, 813-823.
- Vepachedu, V.R., Hirneisen, K., Hoover, D.G., Setlow, P., 2007. Studies of the release of small molecules during pressure germination of spores of *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology* 45, 342-348.
- Vepachedu, V.R., Setlow, P., 2004. Analysis of the germination of spores of *Bacillus subtilis* with temperature sensitive spo mutations in the spoVA operon. *FEMS Microbiology Letters* 239, 71-77.
- Vepachedu, V.R., Setlow, P., 2005. Localization of SpoVAD to the inner membrane of spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 187, 5677-5682.
- Vepachedu, V.R., Setlow, P., 2007a. Analysis of interactions between nutrient germinant receptors and SpoVA proteins of *Bacillus subtilis* spores. *FEMS Microbiology Letters* 274, 42-47.
- Vepachedu, V.R., Setlow, P., 2007b. Role of SpoVA proteins in release of dipicolinic acid during germination of *Bacillus subtilis* spores triggered by dodecylamine or lysozyme. *Journal of Bacteriology* 189, 1565-1572.

- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B., 2011. *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Springer Science & Business Media.
- Walker, M., Phillips, C.A., 2008. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: an increasing threat to the fruit juice industry? *International Journal of Food Science & Technology* 43, 250-260.
- Wei, J., Shah, I.M., Ghosh, S., Dworkin, J., Hoover, D.G., Setlow, P., 2010. Superdormant spores of *Bacillus* species germinate normally with high pressure, peptidoglycan fragments, and bryostatin. *Journal of Bacteriology* 192, 1455-1458.
- 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., Kuipers, O.P., Abee, T., 2016. Bacterial Spores in Food: Survival, Emergence, and Outgrowth. *Annual Review of Food Science Technology* 7, 457-482.
- Wu, R., Gu, M., Wilton, R., Babnigg, G., Kim, Y., Pokkuluri, P.R., Szurmant, H., Joachimiak, A., Schiffer, M., 2013. Insight into the sporulation phosphorelay: crystal structure of the sensor domain of *Bacillus subtilis* histidine kinase, KinD. *Protein Science* 22, 564-576.
- Wu, X., Grover, N., Paskaleva, E.E., Mundra, R.V., Page, M.A., Kane, R.S., Dordick, J.S., 2015. Characterization of the activity of the spore cortex lytic enzyme CwlJ1. *Biotechnology and Bioengineering* 112, 1365-1375.
- Wuytack, E.Y., Boven, S., Michiels, C.W., 1998. Comparative study of pressure-induced germination of *Bacillus subtilis* spores at low and high pressures. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3220-3224.
- Wuytack, E.Y., Michiels, C.W., 2001. A study on the effects of high pressure and heat on *Bacillus subtilis* spores at low pH. *International Journal of Food Microbiology* 64, 333-341.
- Wuytack, E.Y., Soons, J., Poschet, F., Michiels, C.W., 2000. Comparative study of pressure- and nutrient-induced germination of *Bacillus subtilis* spores. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 257-261.
- Xu Zhou, K., Wisnivesky, F., Wilson, D.I., Christie, G., 2017. Effects of culture conditions on the size, morphology and wet density of spores of *Bacillus cereus* 569 and *Bacillus megaterium* QM B1551. *Letters in Applied Microbiology* 65, 50-56.
- Yamazaki, K., Kawai, Y., Inoue, N., Shinano, H., 1997. Influence of sporulation medium and divalent ions on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *Letters in Applied Microbiology* 25, 153-156.
- Yi, X., Setlow, P., 2010. Studies of the commitment step in the germination of spores of *Bacillus species*. *Journal of Bacteriology* 192, 3424-3433.
- Young, S.B., Setlow, P., 2003. Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. *Journal of Applied Microbiology* 95, 54-67.
- Zhang, J., Griffiths, K.K., Cowan, A., Setlow, P., Yu, J., 2013. Expression level of *Bacillus subtilis* germinant receptors determines the average rate but not the heterogeneity of spore germination. *Journal of Bacteriology* 195, 1735-1740.
- Zhang, P., Garner, W., Yi, X., Yu, J., Li, Y., Setlow, P., 2010. Factors affecting variability in time between addition of nutrient germinants and rapid dipicolinic acid release during germination of spores of *Bacillus species*. *Journal of Bacteriology* 192, 3608-3619.

- Zhang, P., Kong, L., Wang, G., Setlow, P., Li, Y.-Q., 2011. Monitoring the wet-heat inactivation dynamics of single spores of *Bacillus* species by using Raman tweezers, differential interference contrast microscopy, and nucleic acid dye fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 4754-4769.
- Zhang, P., Setlow, P., Li, Y., 2009. Characterization of single heat-activated *Bacillus* spores using laser tweezers Raman spectroscopy. *Optics Express* 17, 16480-16491.
- Zhang, Y., Mathys, A., 2018. Superdormant spores as a hurdle for gentle germination-inactivation based spore control strategies. *Frontiers in Microbiology* 9.