



Facultad de Veterinaria  
**Universidad** Zaragoza



## TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

**Identificación de nuevos genes relacionados con la resistencia y  
germinación de esporos de *B. subtilis***

**Identification of novel genes involved in resistance and germination  
of *B. subtilis* spores**

Autor/es:

Ariadna González Diez

Director/es:

Elisa Gayán Ordas

Santiago Condón Uson

Facultad de Veterinaria de Zaragoza

2022 - 2023

## **Índice**

<b>Resumen</b>	<b>2</b>
<b>Abstract</b>	<b>2</b>
<b>1.- Introducción</b>	<b>3</b>
1.1.- Importancia de las bacterias formadoras de esporos en la industria alimentaria	3
1.2.- Especies bacterianas formadoras de esporos	4
1.3.- Estructura del esporo	5
1.3.1.- Protoplasto	6
1.3.2.- Membrana interna	7
1.3.3.- Pared celular	7
1.3.4.- Corteza o cortex	7
1.3.5.- Membrana externa	7
1.3.6.- Cubierta o coat	7
1.3.7.- Exosporio	8
1.4.- Esporulación	8
1.5.- Germinación	9
1.5.1.- Activación	9
1.5.2.- Fase I y II	10
1.5.3.- Crecimiento	11
1.6.- Mecanismos de resistencia al calor	11
1.7.- Cinética de inactivación de los esporos por calor	13
1.8.- Estudio de la fisiología de los esporos bacterianos mediante mutantes "knock - out"	14
<b>2.- Justificación y objetivos</b>	<b>15</b>
<b>3.- Metodología</b>	<b>16</b>
3.1.- Microorganismos y medios de cultivo	16
3.2. Tratamientos térmicos	17
3.3.- Recuento de colonias	18
3.4. Cálculo de los parámetros de resistencia	18
3.5. Verificación de la ausencia del gen en los mutantes seleccionados	19
<b>4.- Resultados y discusión</b>	<b>19</b>
4.1.- Optimización del método de esporulación	19
4.2.- Optimización del tratamiento térmico para el cribado de los mutantes	20
4.3.- Cribado de los mutantes por su resistencia al calor	21
4.4.- Confirmación de los cambios de resistencia al calor e identificación de los mutantes seleccionados	22
4.5.- Caracterización de la termorresistencia de los mutantes 71 (pbuE::erm) y 82 (conG::erm)	25
<b>5.- Conclusiones</b>	<b>26</b>
<b>Conclusions</b>	<b>28</b>
<b>6.- Valoración personal</b>	<b>29</b>
<b>7.- Bibliografía</b>	<b>29</b>

## Resumen

La presencia de esporos bacterianos pone en peligro la inocuidad y calidad de los alimentos en los que se encuentran, debido a que producen su deterioro y algunos de ellos proceden de especies patógenas. Los esporos poseen una alta resistencia a diversos agentes de conservación, siendo únicamente los tratamientos térmicos capaces de producir su muerte. La inactivación de los esporos hasta niveles aceptables implica la aplicación de tratamientos de elevada intensidad que pueden alterar en exceso las propiedades nutricionales y sensoriales de los alimentos, y en ocasiones los esporos de algunas especies pueden sobrevivir a los tratamientos preestablecidos. Por ello, se necesita diseñar y desarrollar nuevas estrategias y tratamientos de conservación para su eficaz inactivación, lo que requiere conocer mejor sus propiedades de resistencia.

En este estudio se trató de identificar nuevos genes relacionados con la resistencia al calor de los esporos de *B. subtilis* utilizando una colección de mutantes “knock-out”, tras poner a punto la metodología de esporulación y cribado de los cambios de resistencia. Tras el cribado de un total de 119 mutantes, se encontró que la ausencia del gen *pbuE* (que codifica un exportador de hipoxantina) aumentaba la resistencia al calor. Por otro lado, la delección de los genes *kimA* (que codifica un transportador de potasio de alta afinidad) y *conG* (que participa en la conjugación) sensibilizaba frente al calor. El mutante carente de este último gen era el más sensible al calor principalmente debido a una menor longitud del hombro, relacionado con la reparación y acumulación de daños, en sus curvas de supervivencia. Ninguno de estos tres genes se había relacionado con anterioridad en la resistencia al calor de los esporos.

## Abstract

The presence of bacterial spores endangers the safety and quality of the food in which they are found, because they cause spoilage and some of them come from pathogenic species. Spores are highly resistant to various preservation agents, and only heat treatments are capable of killing them. Inactivation of spores to acceptable levels involves the application of high intensity treatments that can excessively alter the nutritional and sensory properties of foods, and sometimes spores of some species can survive pre-established treatments. Therefore, there is a need to design and develop new preservation strategies and treatments for their effective inactivation, which requires a better understanding of their resistance properties.

This study sought to identify new genes related to heat resistance in *B. subtilis* spores using a collection of knock-out mutants, after fine-tuning the methodology for sporulation and screening for changes in resistance. After screening a total of 119 mutants, the absence of the *pbuE* gene (encoding a hypoxanthine exporter) was found to increase heat resistance. On the other hand,

deletion of the *kimA* (encoding a high-affinity potassium transporter) and *conG* (involved in conjugation) genes increased heat sensitisation. The mutant lacking the latter gene was the most heat-sensitive mainly due to a shorter shoulder length, related to damage repair and accumulation, in its survival curves. None of these three genes had previously been implicated in spore heat resistance.

## 1.- Introducción

### 1.1.- Importancia de las bacterias formadoras de esporos en la industria alimentaria

Las principales especies bacterianas responsables de la formación de esporos que afectan directamente a la industria alimentaria forman parte de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*. La esporulación se da cuando el entorno en el que se encuentran las células vegetativas no es favorable para su crecimiento y desarrollo; éstas forman en un compartimento intracelular un esporo, que se libera al exterior cuando se lisa la célula madre. Los esporos son capaces de resistir y sobrevivir a gran cantidad de estrés ambiental durante un tiempo prolongado. Carecen de actividad metabólica, por lo que se encuentran en un estado de latencia. Cuando los esporos se encuentran en condiciones ambientales favorables, germinan y se transforman en una célula vegetativa. La germinación de los esporos y la posterior multiplicación de las células vegetativas en los alimentos es lo que realmente produce el deterioro de los alimentos, y en caso de microorganismos patógenos, problemas de seguridad alimentaria (Wells-Bennik, 2016).

Actualmente, el único método de conservación capaz de inactivar los esporos bacterianos es el calor a intensidades elevadas, como son los tratamientos de esterilización. Sin embargo, estos tratamientos afectan negativamente a las propiedades sensoriales y nutricionales. Es por ello que estos últimos años se han desarrollado tratamientos alternativos, frecuentemente combinando distintos métodos de conservación, para poder llegar a obtener la misma eficacia letal sobre los esporos que los tratamientos convencionales de esterilización. Entre ellos se incluye la exposición de los alimentos a la radiación ultravioleta, aunque debido a su baja capacidad de penetración en los alimentos resulta prácticamente imposible conseguir la esterilidad comercial sin dañar el exceso en producto (Gayán, 2013). También destacan las estrategias basadas en la germinación - inactivación, aquellas en las que se combina un método para inducir la germinación de los esporos para posteriormente aplicar un tratamiento de inactivación moderado para atacar a los esporos ya germinados (Wei, 2010). Por ejemplo, la aplicación de un tratamiento de alta presión hidrostática provoca la germinación y pérdida de resistencia de los esporos, que junto con la aplicación de calor a baja intensidad, sería suficiente para inactivarlos (Ahn et al. 2007). El inconveniente presente en este proceso combinado es que el estímulo de germinación tiene que ser capaz de inducirla a toda la

población que contamina el alimento, de lo contrario, los esporos no germinados no se destruirán con el tratamiento de inactivación.

A pesar de que el tratamiento térmico es muy eficaz para la inactivación de los esporos, existen algunos muy termorresistentes, capaces de sobrevivir a los tratamientos de máxima intensidad. El hecho de que existan diferentes especies bacterianas capaces de formar esporos, hace que haya una diversidad en cuanto a la resistencia de los esporos (Castañeda et al., 2014). Además, las condiciones de esporulación en su hábitat natural, como la temperatura, el pH y la actividad de agua, también influyen en la resistencia al calor de los esporos (Bressuire-Isoard, 2018). Todo esto dificulta la predicción de la resistencia al calor de los esporos que contaminan los alimentos, y por tanto establecer las condiciones de tratamiento óptimas para reducir el riesgo de supervivencia aceptable.

Para controlar los esporos más termorresistentes sin elevar excesivamente la intensidad de los tratamientos térmicos, se puede combinar la aplicación de calor con otros métodos de conservación que inhiban la germinación o el crecimiento de las células germinadas. El ácido sórbico (a pH 5,5) (van Melis et al., 2014) y pequeñas concentraciones de algunos alcoholes como pentanol y hexanol pueden bloquear que se complete la germinación e inicien el crecimiento (van Melis et al. 2011, 2012). También se puede combinar los tratamientos térmicos con sustancias antimicrobianas que consigan inactivar los esporos que queden subletalmente dañados. La capacidad de reparación de los esporos subletalmente dañados por el efecto del calor depende de las condiciones ambientales en las que se encuentran tras el tratamiento, tales como la composición de la matriz del alimento (pH, presencia de microbianos, actividad de agua, nutrientes) y las condiciones de almacenamiento (humedad y oxígeno) (Mafart 2000, Samapundo et al 2014, Olía et al. 2008, Warda et al. 2015). La combinación del calor con la presencia de algunos antimicrobianos naturales, como la nisinina, permite mejorar la eficacia letal del tratamiento térmico sobre los esporos (Ros-Chumillas, 2015).

La mayor parte de estas estrategias se han desarrollado fortuitamente, sin tener una base sólida del mecanismo de acción de los agentes empleados. Por tanto, para diseñar de forma más rápida y eficiente nuevos métodos que mejoren la eficacia de los tratamientos térmicos, se necesita conocer en detalle el impacto del calor a nivel celular y molecular en los esporos.

## 1.2.- Especies bacterianas formadoras de esporos

Existen bacterias capaces de formar esporos que además, son consideradas como microorganismos patógenos; pueden causar toxinfecciones por consumo de alimentos contaminados. Entre ellas destacan las especies de *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* y

*Bacillus cereus* (EFSA, 2005). Además, algunas especies esporuladas consideradas principalmente como alterantes, como *B. subtilis*, han sido responsables de varios brotes de intoxicación alimentaria (EFSA, 2016).

Las bacterias de *C. botulinum* producen neurotoxinas, algunas de ellas resistentes al calor, cuyo consumo a concentraciones muy bajas causa la enfermedad del botulismo, que tiene una mortalidad muy elevada (Adams y Moss, 1997; Jay, 2000). Por ello, la inactivación de los esporos de este microorganismo hasta un riesgo aceptable se usa de referencia para establecer las condiciones de tratamiento mínimas a las que deben ser expuestos los alimentos almacenados a temperatura ambiente y de pH superior a 4,5. En concreto, estos alimentos deben de ser sometidos a un tratamiento térmico de 120°C durante al menos 3 minutos o tratamientos de eficacia letal equivalente (Anderson et al. 2011). Sin embargo, existen microorganismos esporulados con mucha mayor resistencia al calor, y por tanto para garantizar la estabilidad de los alimentos frecuentemente se requieren tratamientos de mayor intensidad. Los esporos más resistentes al calor generalmente proceden de especies termófilas, que pueden crecer o poseen temperaturas de crecimiento óptimas superiores a 45°C.

La mayoría de *Bacillus* y *Clostridiuim* spp., junto con otros géneros esporulados como *Geobacillus*, *Alicyclobacillus* y *Paenibacillus*, pueden producir alteraciones en los alimentos de distinta índole como consecuencia de la excreción de enzimas y metabolitos, y la producción de gas durante su crecimiento. Por ejemplo, el abombamiento de latas de conserva y aparición de manchas blancas en el alimento es indicativo de que este se encuentra contaminado por *Clostridium botulinum*, responsable de la intoxicación botulínica originada por la toxina botulínica generada por este microorganismo.

El “sour - flat spoilage” o acidez plana en conservas es provocado por *Geobacillus stearothermophilus*, ya que este microorganismo metaboliza los hidratos de carbono presentes en el medio produciendo ácidos orgánicos que le confieren un sabor agrio (Durand, 2015). Una particularidad de este tipo de degradaciones es que no se genera gas (Durand, 2015), por lo que los recipientes de las conservas no presentan un abombamiento de la parte superior.

La supervivencia de esporos de *B. subtilis* en la masa de productos horneados tales como el pan, provocan una pérdida de textura dando lugar al llamado “pan viscoso”.

### 1.3.- Estructura del esporo

La mayor resistencia de los esporos al calor y otros tratamientos con respecto a las células vegetativas se debe a que presentan grandes diferencias estructurales (Bressuire - Isoard, 2018). A

continuación se describen las distintas partes de un esporo, las cuales aparecen representadas en la Figura 1.

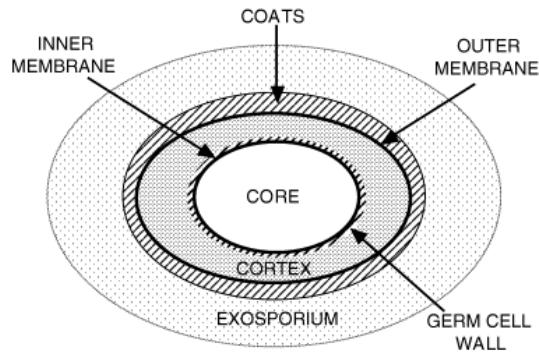


Figura 1.- Estructura de los esporos. Las capas del esporo no están dibujadas a escala y los tamaños de las distintas capas varían significativamente entre los esporos de diferentes especies. Imagen tomada de Setlow (2006).

### 1.3.1.- Protoplasto

Como ya se ha mencionado, el protoplasto o núcleo del esporo se encuentra fuertemente deshidratado, impidiendo la movilización rotacional de las proteínas que contiene. El agua libre presente en el núcleo constituye entre el 25 y 55 % del peso del protoplasto, mientras que en las células vegetativas, el agua del citoplasma supone el 85 % de su peso (Gerhardt y Marquis, 1989). Este bajo contenido de agua permite que el esporo se encuentre en un estado latente de nula actividad metabólica y le confiere resistencia a diversos estreses, como los tratamientos con calor (Gerhardt y Marquis, 1989).

Contiene gran parte de las enzimas del esporo, DNA, RNA y ribosomas; además de dos moléculas pequeñas que tienen gran relevancia en relación a la resistencia de los esporos. Una de estas moléculas es el ácido dipicolínico (DPA), que se encuentra quelado por cationes divalentes, principalmente con  $\text{Ca}^{+2}$  (Gerhardt y Marquis, 1989). El producto quelado se denomina dipicolinato cálcico (Ca-DPA), y en la naturaleza se encuentra exclusivamente en el interior de los esporos bacterianos. Actúa como reserva de  $\text{Ca}^{+2}$ , y su acumulación durante la esporulación favorece la deshidratación del protoplasto.

Las otras moléculas importantes que influyen en la resistencia de los esporos, y que también se encuentran de forma exclusiva en su interior, son las proteínas solubles en ácido ("small, acid - soluble spore proteins" - SASP) de tipo  $\alpha$  y  $\beta$ . Estas proteínas se sintetizan únicamente en el esporo en su desarrollo final, previamente a la absorción de DPA. Se unen al DNA de forma saturada, alterando su estructura y propiedades y confiriéndole protección; tiene un papel fundamental en la resistencia de los esporos al calor, radiación UV y a muchas sustancias químicas (Setlow, 2006).

### *1.3.2.- Membrana interna*

Protegiendo al protoplasto, se encuentra la membrana interna, capa cuya fuerte permeabilidad le confiere gran resistencia a los esporos frente a sustancias químicas, en especial aquellas cuya finalidad es cruzar esta barrera para lograr dañar el DNA del esporo (Nicholson et al. 2000; Setlow, 2000). Se presenta muy comprimida, y los lípidos que la conforman se encuentran inmóviles hasta el momento de germinación de los esporos (Cowan et al., 2004). Además contiene las proteínas necesarias para la germinación.

### *1.3.3.- Pared celular*

Cubre la membrana interna y se sitúa muy cerca de la corteza, por lo que posee una estructura similar, diferenciándose en el tipo de peptidoglicano que posee, ya que éste se presenta menos acetilado y con un grosor diferente. Esta pared germinal se convierte en la pared celular tras la degradación del peptidoglicano presente en la corteza durante la germinación del esporo. Las dos capas de peptidoglicano presentes son un factor esencial para la supervivencia y desarrollo del esporo, ya que su hidrólisis puede llegar a provocar su muerte (Setlow, 2011).

### *1.3.4.- Corteza o cortex*

La estructura de la corteza está constituida por peptidoglicano, similar al peptidoglicano de la célula vegetativa, presentando algunas variaciones (Poham, 2002); el 30% del NAM (Ácido N-Acetilmurámico) posee tetrapéptidos normales pero el grado de entrecruzamiento es muy bajo (6%), el 15% del NAM tiene solo la L-alanina inicial en lugar de tetrapéptido y el 55% del ácido murámico modificado producido por condensación del -COOH lactilo con el -NH<sub>2</sub>. Esta capa es fundamental durante la formación del esporo, ya que favorece la deshidratación del protoplasto, y para el mantenimiento de su bajo contenido en agua en el esporo libre (Setlow, 2006). Además, le aporta resistencia mecánica, por lo que es un elemento esencial para el desarrollo total de la resistencia frente al calor y otros métodos de conservación físicos (Wells - Bennik, 2016).

### *1.3.5.- Membrana externa*

Rodea a la corteza y es esencial en la formación del esporo, pero en el esporo maduro se desconoce si participa en la resistencia del mismo (Leggett et cols. 2012) o si actúa como barrera de permeabilidad (Setlow, 2006). Su eliminación no produce ningún efecto destacable respecto a la resistencia al calor, radiación UV o sustancias químicas (Nicholson et al. 2000; Setlow, 2000).

### *1.3.6.- Cubierta o coat*

Se trata de una estructura compleja formada por varias capas compuestas de proteínas; en *B. subtilis* se han cuantificado más de 50 proteínas (Setlow, 2006). Algunas de estas proteínas actúan como barrera inhibiendo el paso de sustancias químicas y enzimas dañinas de alto peso molecular, otras están involucradas en la estructuración de la propia cubierta y del exosporio; sin embargo, de

otras aún se desconoce qué función presentan (Setlow, 2006). Además, cada vez hay más evidencias de que la cubierta tiene un papel muy importante en la resistencia de los esporos al calor (Ghosh, 2008).

#### *1.3.7.- Exosporio*

El exosporio es la capa más externa del esporo (se encuentra en contacto con el medio ambiente), compuesta por proteínas y algunas glicoproteínas de las cuales se desconoce su función, pero podrían ser elementales en la interacción esporo - organismo diana de aquellos microorganismos que fuesen patógenos (Setlow, 2006).

Se encuentra solo en algunas especies; *B. subtilis* carece de él o, de poseerlo, se presenta con un tamaño ínfimo, siendo la corteza proteica su capa más externa.

### 1.4.- Esporulación

La esporulación se inicia cuando las bacterias se encuentran en condiciones adversas, generalmente por la falta de nutrientes, y es el último recurso al que accede la bacteria para sobrevivir ya que este proceso requiere de mucho tiempo, energía y es irreversible. Esto explica también que sea un proceso con una regulación genética estrictamente controlada (Rodriguez, 2019). La regulación del proceso de esporulación del microorganismo *B. subtilis* es una de las mejores estudiadas.

La esporulación se inicia a través del regulador transcripcional Spo0A. Este se activa al pasar a un estado fosforilado (Spo0A - P), que se desencadena al detectarse unas señales internas y externas que se integran en una cascada de transferencia de fosfatos cuyo acceptor final es la proteína Spo0A. Conforme aumenta la intensidad o el tiempo de exposición al estrés ambiental, se acumulan mayores cantidades de Spo0A, y al alcanzar cierto nivel se pone en marcha la primera etapa de la esporulación (Rodriguez, 2019). La proteína Spo0A puede actuar como inhibidor o activador de aproximadamente unos 500 genes durante las primeras etapas del desarrollo (Molle et al., 2003). Entre ellos produce la activación secuencial del factor  $\sigma^F$  en el pre-esporo, el factor  $\sigma^E$  en la célula madre, el factor  $\sigma^G$  en el pre-esporo y el factor  $\sigma^K$  en la célula madre (Pírez, 2006).

La esporulación (Figura 2) comienza con la replicación del DNA para que el esporo contenga una copia del cromosoma. Posteriormente, se produce una división asimétrica, dando lugar al pre-esporo (“forespore”) y la célula madre. Tras esta división, en cada compartimento se llevan a cabo dos procesos distintos, controlados por factores de transcripción específicos como se ha mencionado antes (de Hoon et al., 2010). Después se forma la cubierta del esporo y el resto de las envolturas, y finalmente la célula madre se autolisa. Una vez liberado, el esporo puede sufrir ciertos

cambios estructurales relacionados con el contenido en agua y la corteza, lo que se conoce como maduración (Sanchez - Salas et al., 2011).

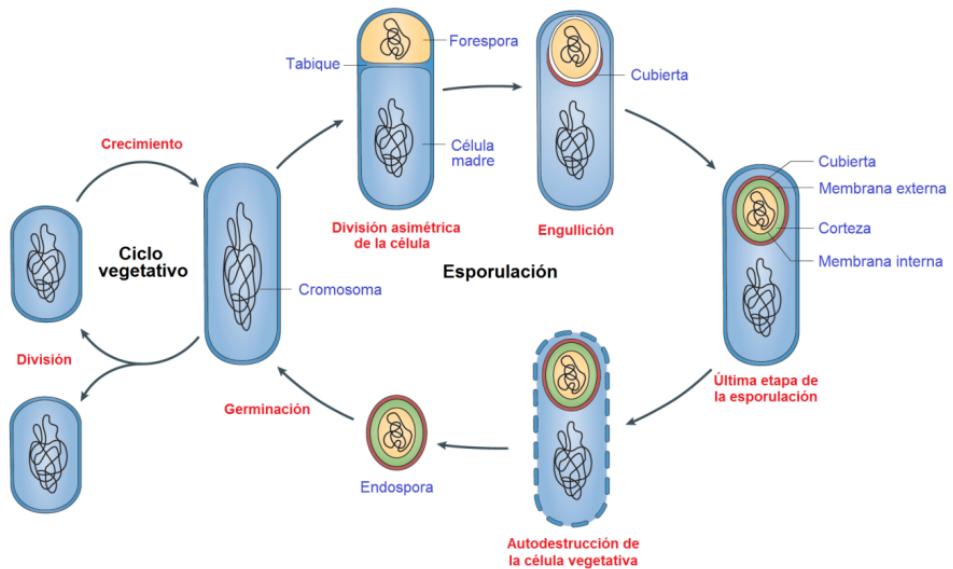


Figura 2. Fases de esporulación en *B. subtilis*. Imagen tomada de Rodriguez (2019).

### 1.5.- Germinación

La germinación es el proceso por el cual un esporo se convierte en una célula vegetativa cuando las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo de las bacterias. Tradicionalmente se ha creído que el proceso no requiere energía, aunque recientemente se ha propuesto que la síntesis de proteínas comienza en las fases iniciales de la germinación (Zhou et al., 2022). La germinación se produce siguiendo tres fases: activación, fase I, fase II y crecimiento (Figura 3); que se describen a continuación.

#### 1.5.1.- Activación

La germinación se desencadena gracias a la presencia de diversas sustancias, llamadas germinantes, que pueden ser nutrientes únicos (principalmente nucleósidos, azúcares y aminoácidos) o combinados con sales (como KCl o KBr), sustancias químicas (como el Ca-DPA y la dodecilamina) y agentes físicos (como el calor o las altas presiones hidrostáticas) (Setlow y Johnson, 2019); los cuales generalmente activan la germinación de distintas formas. Cada microorganismo responde a unos germinantes específicos. En el caso de los nutrientes, cada nutriente se une específicamente a unos receptores localizados en la membrana interna, denominados receptores de la germinación (“germinant receptors” - GR), que son característicos de cada cepa (Setlow, 2013). *B. subtilis* presenta tres tipos de GR, GerA que une específicamente a L-alanina, y GerB y GerK, que responden frente a una mezcla de glucosa, fructosa, asparagina e iones potasio (Setlow, 2013). Sin embargo, debido a la actividad de dos enzimas presentes en el exosporio, la alanina racemasa y la

nucleósido hidrolasa, la L-alanina puede ser metabolizada a D-alanina, sustancia que inhibe de forma contundente la germinación de los esporos. Tras la unión de los nutrientes con los GR, la señal se transduce hacia el interior del esporo para proseguir la germinación, se cree que a través de la proteína GerD (Setlow, 2013).

Las sustancias químicas no nutritivas (Ca-DPA y dodecilamina) activan la germinación sin involucrar a los receptores de germinación. El Ca-DPA induce la germinación activando las enzimas líticas del córtex, es decir, induciendo directamente la fase I y II de la germinación (Figura 3). La dodecilamina, se cree que actúa de forma directa en la membrana interna estimulando la salida de Ca-DPA a través de los canales SpoVA (Moir y Cooper, 2015).

La aplicación de tratamientos térmicos subletales activa la germinación estimulando la respuesta de los receptores de germinación en presencia de sus nutrientes específicos, es decir, el calor da lugar a que los GR sean más sensibles a los agentes germinantes nutritivos (Luu et al., 2015). Los tratamientos de altas presiones hidrostáticas a intensidades moderadas (200-300 MPa) también favorecen la interacción de los nutrientes con los GR.

Existen subfracciones de esporos que no responden a un estímulo el cual activa la germinación en la mayoría de la población; estos esporos se llaman esporos superlantents (Ghosh y Setlow, 2009). Estos esporos son incapaces de germinar cuando se enfrentan a un germinante en un medio donde se dan las condiciones ambientales óptimas para la germinación, pero son capaces de iniciar el proceso cuando se les aplica un estímulo distinto u otro adicional (Ruiz, 2021).

Una vez que se activa la germinación, el proceso es irreversible, es decir la germinación prosigue aunque se elimine el estímulo de germinación del medio.

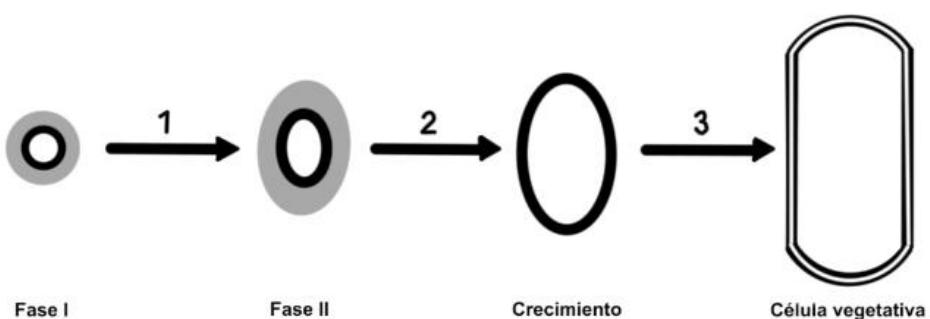


Figura 3. Etapas de la germinación en *B. subtilis*. Imagen obtenida de Abel - Santos (2015) (reeditada).

#### 1.5.2.- Fase I y II

El esporo se encuentra deshidratado y posee una gran reserva de DPA y minerales, mantenidos en parte por la corteza. Durante la fase I, se liberan gran parte de los minerales y del DPA, a través de los canales SpoVA, y el protoplasto se hidrata parcialmente. Como consecuencia, el

esporo pierde gran parte de su resistencia al calor. En la fase II, se degrada la corteza mediante las enzimas líticas del córtex, que en *B. subtilis* son SleB y CwlJ, y el esporo se libera de la cubierta, lo que permite que el agua penetre en el protoplasto hasta alcanzar el mismo nivel que en la célula vegetativa y pierda totalmente su resistencia al calor (Setlow y Johnson, 2019).

En la fase II, también se degradan las proteínas SASP que envuelven al DNA, de forma que los aminoácidos que las constituían son reutilizados para la síntesis de nuevas proteínas en la nueva célula vegetativa (Setlow, 2003). El 3 - fosfoglicérico se metaboliza en 2 - fosfoglicérico y este en PEP, lo que permite que done fosfato para la producción de ATP; por otro lado, la RNA polimerasa comienza a sintetizar RNA, comenzando así la transcripción de genes vegetativos.

#### *1.5.3.- Crecimiento*

Durante esta última etapa, el esporo activa su metabolismo, la síntesis de proteínas y la replicación del DNA para proceder con la multiplicación celular.

### 1.6.- Mecanismos de resistencia al calor

Aunque el mecanismo de inactivación por calor de los esporos todavía no se haya determinado, sí que se han identificado ciertos componentes y estructuras que influyen en su termorresistencia. Es importante diferenciar el modo de acción del calor húmedo y seco, ya que se sabe que actúan por mecanismos distintos. En este trabajo nos centramos en lo que hasta ahora se conoce sobre el mecanismo de acción del calor húmedo, que es el que participa en el procesado de alimentos.

La mayor parte de lo que conocemos sobre el mecanismo de acción del calor sobre los esporos se ha obtenido estudiando los factores estructurales y genéticos que influyen en la variabilidad de la resistencia al calor de los esporos procedentes de distintas especies y cepas (Wells - Bennik et al., 2016). También, parte de este conocimiento deriva del estudio del efecto que tienen los cambios de las condiciones ambientales de esporulación en la resistencia al calor de los esporos procedentes de una misma cepa. Entre estos, el más estudiado es la temperatura. Diversos estudios han demostrado que la resistencia al calor aumenta con la temperatura de esporulación (Melly et al., 2002; Baril et al., 2012). El incremento del contenido en cationes divalentes en el medio de esporulación también aumenta la resistencia al calor en algunas especies esporuladas (Oomes y Brul, 2004; Granger et al. 2011). La presencia de estos minerales en el medio es necesaria para permitir la maduración del esporo y que de esta forma pueda alcanzar su máximo desarrollo de termorresistencia (Sanchez - Salas et al., 2011). Un descenso de la actividad de agua del medio de esporulación también produce un aumento de la termorresistencia de los esporos, aunque esta depende de la temperatura de tratamiento estudiada y el soluto empleado (Freire et al., 2023). Por el

contrario, el descenso del pH del medio de esporulación con respecto al óptimo, produce esporos más sensibles (Freire et al., 2023). Es de esperar que los cambios ambientales en los hábitat naturales donde se desarrollan las bacterias formadoras de esporos también influyan en la resistencia al calor de los esporos que luego contaminan los alimentos (Heyndrickx, 2011), y por tanto es importante tenerlos en cuenta a la hora de optimizar la intensidad de los tratamientos térmicos.

Un factor importante que contribuye a la elevada resistencia al calor de los esporos es el bajo contenido de agua en el protoplasto (Setlow, 2006). De hecho, el contenido de agua del protoplasto se relaciona inversamente con la resistencia al calor de los esporos procedentes de distintas cepas esporuladas (Beaman, 1982). Además, el incremento de la termorresistencia con la temperatura de esporulación se ha relacionado con una menor cantidad de agua presente en el protoplasto (Melly et al., 2002). Se cree que gran parte de la deshidratación del protoplasto se debe a la absorción de DPA y  $\text{Ca}^{+2}$  durante la esporulación. Se ha demostrado en un mutante de *B. subtilis* que carecía de los canales SpoVA encargados de la importación de DPA, que éste presentaba mayor cantidad de agua en el protoplasto, lo que le hacía más termosensible (Melly et al., 2002). Recientemente se ha demostrado que el agua presente se encuentra en estado libre y móvil, y que por tanto es más probable que la mayor termorresistencia de los esporos se deba a la baja movilidad de las proteínas por el cúmulo de compuestos como el DPA (Wishwas, 2016).

En relación al contenido en minerales del protoplasto, a mayor es, mayor termorresistencia presenta el esporo; de igual manera se ha relacionado que a mayor sea la temperatura de esporulación de la bacteria, mayor será el nivel de mineralización del núcleo. Esto se ha demostrado en numerosas ocasiones al desmineralizar y remineralizar los esporos con minerales específicos, siendo el  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{Mn}^{+2}$  los que proporcionan mayor resistencia (Beaman y Gerhardt, 1986). El mecanismo por el cual una alta mineralización supone un aumento de la resistencia al calor aún es desconocido.

Las SASP que se encuentran en el protoplasto saturando el DNA juegan un papel esencial en la protección frente al calor mediante un mecanismo que aún no se conoce; aquellos esporos modificados genéticamente que carecen de estas proteínas, son significativamente más termosensibles al calor que la cepa parental (Setlow, 2006).

El estado de la membrana interna es un factor esencial en la resistencia al calor. A pesar de tener la misma composición que la membrana citoplasmática de las células vegetativas, ésta posee una mayor rigidez ya que se encuentra altamente comprimida, contribuyendo a mantener la deshidratación del protoplasto (Rodriguez, 2019); esto le confiere una baja permeabilidad al agua y a sustancias químicas dañinas, además de participar activamente en la termorresistencia del esporo.

Las diferencias de termorresistencia entre esporos de *Bacillus spp.* se han asociado a variaciones en el número de copias del operón *spoVA<sup>2mob</sup>* presentes en su genoma; aquellos esporos que presentan una o más copias del operón adquieren una resistencia al calor (100°C) de 10 a 100 veces superior a aquellas cepas que carecen de él (Berendsen et al., 2016). La mayor resistencia de los esporos que poseen *spoVA<sup>2mob</sup>* se ha atribuido a un gen de éste operón, *2duf*. El producto de este gen se localiza en la membrana interna, y se cree que protege de los daños del calor a alguna proteína, de naturaleza todavía desconocida, relacionada con el metabolismo y la producción de ATP durante la germinación (Korza et al., 2023). Recientemente se ha observado que la carencia de proteínas homólogas a *2Duf*, como *YetF* que también se localiza en la membrana interna, reduce la resistencia al calor de los esporos de *B. subtilis* (Yu et al., 2023).

#### 1.7.- Cinética de inactivación de los esporos por calor

Tradicionalmente, la cinética de inactivación de una población de esporos frente a una temperatura concreta se ha descrito con una función de exponencial, en la que se asume que para que se produzca la muerte celular debe producirse la inactivación de “una sola molécula clave” del interior del esporo, y que todos los esporos de la población tienen la misma probabilidad de ser inactivados a cualquier tiempo de tratamiento. Sin embargo, en las curvas de inactivación por calor de los esporos es frecuente observar hombros, una fase en la que el recuento microbiológico se mantiene constante, antes de la caída exponencial. Esto se ha atribuido a que existen varias moléculas o estructuras diana que deben ser dañadas por el calor, y también a los mecanismos de reparación celulares (Ruiz, 2021). Tras un tratamiento térmico, existen estadios celulares intermedios entre muerte y supervivencia; los esporos que sufren daños subletales deben ser reparados para convertirse en una célula vegetativa funcional. A pesar de que los esporos son estructuras inertes sin actividad metabólica, poseen enzimas y moléculas que participan en el proceso de reparación y que se activan una vez comienza la etapa de germinación. Si los daños son tales que saturan los mecanismos de reparación, el esporo acaba muriendo (Setlow, 2006). Sin embargo, aún se desconoce de forma exacta cómo funcionan estos sistemas de reparación. Los hombros también se han atribuido a la activación de la germinación en aquellas especies que precisan un estímulo térmico para iniciar este proceso.

Por otro lado, en ocasiones se observan colas en las gráficas de supervivencia, las cuales se han atribuido a la presencia de una subpoblación muy resistente al calor o la presencia de agregados de esporos. También pueden deberse a artefactos metodológicos, zonas de la cámara de tratamiento que no alcanzan la temperatura deseada (Ruiz, 2021).

### 1.8.- Estudio de la fisiología de los esporos bacterianos mediante mutantes “knock - out”

A pesar del gran avance en los estudios de la fisiología de los esporos bacterianos, sigue habiendo muchas incógnitas. Las especies *B. subtilis* y *B. cereus* han sido las más estudiadas y se conoce muy bien lo que ocurre durante la esporulación y germinación a nivel celular, pero no se conocen muchos de los factores moleculares que regulan estos procesos. También se desconocen muchos aspectos relacionados con sus propiedades de resistencia, lo que dificulta el poder predecir y evitar que la probabilidad de supervivencia tras la aplicación de métodos de inactivación sea superior a la esperada, y conocer si pueden germinar durante el almacenamiento deteriorando al alimento.

Las primeras investigaciones realizadas respecto al funcionamiento de los esporos se centraban en el estudio de los cambios de comportamiento de los esporos al modificar las condiciones ambientales de esporulación o germinación, y en evaluar el impacto de estos factores ambientales en la estructura y composición de los esporos. Gracias a los avances en el conocimiento de los genes y técnicas de manipulación genética, actualmente se pueden utilizar técnicas moleculares más directas y fiables para estudiar la fisiología de los esporos.

La bacteria modelo para el estudio de esporos bacterianos a nivel molecular es *B. subtilis*; la secuencia de su genoma se determinó en 1997 y se ha podido determinar la función de 2.300 genes de los 4.100 que contiene (Ogasawara, 2000). Se han desarrollado multitud de herramientas de ingeniería genética que permiten obtener mutantes “knock-out” de *B. subtilis* con relativa facilidad. Además, las cepas de laboratorio poseen competencia natural, es decir, pueden captar con facilidad el DNA externo sin necesidad de que las células sean manipuladas. Todo esto ha permitido que existan diversas colecciones de mutantes “knock-out” de *B. subtilis*, en las que existe un mutante por cada gen no esencial (Koo et al. 2017). Resulta muy complejo realizar un estudio sistemático de todas las propiedades de interés en todos los mutantes “knock-out”; por ello en muchos estudios se realiza previamente un cribado o “screening” de una o varias características específicas.

Las colecciones de mutantes “knock-out” se han empleado para definir los genes esenciales para la esporulación. Koo et al. (2017) realizaron un cribado de los mutantes de una colección “knock-out” de *B. subtilis* que eran incapaces de esporular, identificando 73 genes adicionales a los 101 que ya se conocían. Entre ellos se encontraron los genes *phrA* y *phrE*, que codifican dos péptidos relacionados con el “quorum sensing”; los genes *ywmB* y *yqzE*, que se identificaron como activadores de los factores  $\sigma^E$  y  $\sigma^K$  que actúan en el pre-esporo; los genes *yabM* y *ykvU*, que codifican flipasas lipídicas cuya función no está bien caracterizada; y el gen *yqlf*, que es un regulador de la gluconeogénesis.

Por otra parte, en el estudio realizado por Sayer et al. (2019), utilizando de igual manera una colección de mutantes “knock-out” obtenidos mediante la inserción de un transposón, se identificaron genes que tras su delección, impedía que los esporos germinaran correctamente en presencia de L-valina en comparación a la cepa parental. De esta forma, se descubrió que los genes *ylbC*, *dnaJ*, *sipT* y *hfq*, que en principio no se relacionaban con la germinación y esporulación, participan en la germinación con L-valina.

En el estudio de Chan et al. (2022), se utilizó una colección de mutantes obtenidos por inserción de un transposón para identificar los genes que participan en las primeras fases de la especulación, donde el peptidoglicano de la célula madre envuelve al pre-esporo. Así se identificaron dos proteínas nuevas, YrvJ and MurAB, que intervienen en este proceso.

## 2.- Justificación y objetivos

La industria alimentaria tiene que garantizar la producción de alimentos inocuos, con determinados criterios de calidad organoléptica y nutricional, y con una vida útil prolongada. Dentro de los microorganismos que ponen en riesgo la seguridad y estabilidad de los alimentos, las bacterias esporuladas tienen gran relevancia. Sus esporos son muy resistentes a la mayoría de procesos de conservación, y el único tratamiento efectivo contra este tipo de microorganismos es el calor a elevadas temperaturas. Aunque los tratamientos térmicos de esterilización puedan asegurar la inocuidad de los alimentos, paralelamente causan la pérdida de las características organolépticas y nutricionales de éstos. Además, existen algunos esporos muy resistentes al calor, que pueden sobrevivir a los tratamientos de esterilización convencionales y causar el deterioro de los alimentos. Por ello, se necesitan desarrollar nuevos métodos de inactivación o estrategias para mejorar la eficacia de los tratamientos térmicos, que permitan garantizar la destrucción de los esporos de microorganismos patógenos y alterantes hasta niveles aceptables evitando o minimizando los efectos adversos del calor. Esto requiere conocer en profundidad el efecto del calor en los microorganismos esporulados. A pesar de que se han realizado muchas investigaciones al respecto, todavía se desconoce cuál es el mecanismo real del efecto letal del calor en los esporos, ni tampoco a qué se debe la alta variabilidad en resistencia entre esporos de distintas cepas y como las condiciones de esporulación modifican su resistencia.

El principal objetivo perseguido por este Trabajo de Fin de Grado es identificar nuevos genes de las bacterias esporuladas que favorezcan la elevada resistencia al calor de los esporos a través del estudio del efecto de calor en una colección de mutantes “knock-out” de *B. subtilis*, organismo esporulado que se usa de modelo en las investigaciones. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- Optimización del protocolo de esporulación para obtener suspensiones de esporos de múltiples cepas simultáneamente.
- Optimización del tratamiento térmico de cribado para seleccionar mutantes sensibles o resistentes.
- Evaluar la resistencia de un elevado número de mutantes.
- Confirmar e identificar los mutantes seleccionados como resistentes o sensibles.
- Estudiar en detalle la cinética de inactivación por calor de los mutantes más relevantes.

### **3.- Metodología**

#### 3.1.- Microorganismos y medios de cultivo

Los microorganismos utilizados durante este trabajo fueron la cepa parental o “Wild Type” (WT) de *B. subtilis* 168 y una colección de mutantes “knock-out” obtenidos a partir de la sustitución de cada uno de los genes no esenciales de dicha cepa parental por un gen de resistencia a la eritromicina y lincomicina (Koo BM, 2016). En total se utilizaron 119 mutantes seleccionados al azar. Todos los microorganismos se conservaron a una temperatura de -80°C.

Para la obtención de los esporos de cada una de las cepas, se revitalizaron las células en un tubo de ensayo que contenía caldo de cultivo CNEL (Caldo Nutritivo suplementado con 0,6% de Extracto de Levadura) y una concentración de 1,0 µg/ml y 12,5 µg/ml de eritromicina y lincomicina respectivamente, para evitar el crecimiento de otros microorganismos contaminantes. Estos tubos se llevaron a incubación a 37°C durante 24 h con una agitación de 300 rpm.

Se probaron dos medios de esporulación, medio Zeu (Ruiz, 2022) y el medio 2xSG (Freire, 2023), tanto en estado sólido como en líquido. Cuando se esporuló en medio sólido, se sembraron 2 placas por cada una de las cepas mutantes y 4 placas para la cepa parental. Se probaron dos medios de esporulación, medio Zeu (Ruiz V., 2022) y el medio 2xSG (Freire, 2023). Cada placa se sembró con 100 µl del correspondiente cultivo líquido y se llevaron a incubar a 37°C. Cuando se esporuló en medio líquido, se inocularon 5 y 7 µl de cada cultivo líquido en 5 y 7 ml respectivamente de cada medio en placas de 6 multipellos, y se incubaron a 37°C a 300 rpm. El ritmo de esporulación se evaluó mediante un recuento microscópico y también por recuento en placa tras aplicar a la muestra un tratamiento de pasteurización.

Una vez optimizadas las condiciones de cultivo (medio Zeu sólido durante 72 h de incubación), se realizaron tres lotes de esporulación en semanas distintas, en los que se incluían entre 20 y 40 mutantes, siempre junto con la cepa parental. Tras transcurrir el tiempo de esporulación, se recogieron los esporos generados en las placas. Para ello, se echó 2 ml de agua destilada en cada placa y se rascó con un asa de Drigalsky, se recogió todo el líquido de la placa y se

llevó a un Eppendorf, obteniéndose así 1 Eppendorf por placa. Los esporos de cada Eppendorf se lavaron mediante tres centrifugaciones a 14200 rcf durante 10 min y resuspendiéndolos en agua destilada. Tras este lavado, más del 95% de las células observadas con el microscopio eran esporos. Las suspensiones se conservaron en congelación hasta su uso.

### 3.2. Tratamientos térmicos

En primer lugar, se realizó un cribado de los mutantes para seleccionar aquellos que fuesen más sensibles o más resistentes al calor respecto a la cepa WT. El cribado se realizó comparando la inactivación de cada mutante con la de la cepa parental tras un tratamiento térmico a 100°C a punto final, que se realizó en un equipo de PCR (ProFlex). Previamente, se obtuvo la gráfica de supervivencia de la cepa parental a 100°C para determinar el tiempo de tratamiento para reducir 2 unidades logarítmicas de la misma. Para este tratamiento, se diluyeron los esporos 1/1000 en tampón McIlvaine de pH 7,0 alcanzando así una concentración de  $5 \times 10^6$  UFC/ml, y se depositaron 60 µl de esta suspensión en 10 miniEppendorf de 200 µl. Los tubos se incubaron a 100°C y se extrajo un tubo a distintos tiempos, entre 0 y 25 min. Tras los tratamientos, se realizaron diluciones decimales en agua de peptona y se sembraron “spots” de 5 µl de cada dilución en la superficie de placas de ANEL (Agar Nutritivo con 0,6% de Extracto de Levadura). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h.

Para realizar el cribado, los esporos de cada mutante, junto con su correspondiente cepa parental, se diluyeron 1/1000 en el medio de tratamiento y se trataron a 100°C durante 4,5 y 6,0 minutos. Tras este tratamiento, se seleccionaron los mutantes cuya inactivación era 1,5 ciclos logarítmicos superior o inferior respecto a la cepa parental WT.

Posteriormente, se estudió en detalle la cinética de inactivación a distintas temperaturas (a 97°C y 103°C) de los mutantes estudiados en un termorresistómetro TR-SC (Condón y col., 1993). Este equipo consiste en una cámara de tratamiento de 450 ml que contiene un su interior: una resistencia que calienta el medio hasta la temperatura establecida, una sonda de temperatura que lleva el seguimiento y control de la temperatura a la que se encuentra el medio, un sistema de agitación que permite la homogeneización de la temperatura en todo el medio, una entrada de presión que es regulada mediante un manorreductor para poder trabajar a temperaturas superiores a la de ebullición del agua a presión atmosférica, un sistema de extracción de muestras para la toma de muestras a diferentes tiempos durante el tratamiento térmico, un sistema de inyección del inóculo que contiene la muestra y un sistema de refrigeración.

Para realizar los tratamientos, el medio (tampón McIlvaine, pH 7,0) se esterilizó en la cámara a 120°C durante 15 min y se atemperó hasta la temperatura deseada. Una vez alcanzada, mediante una jeringuilla estéril desechable, se inocularon 200 µl de la suspensión a estudiar, con una

concentración de aproximadamente  $5 \times 10^8$  UFC/ml. Durante el tratamiento, se extrajeron a distintos tiempos muestras de 200 µl en placas de Petri para ser sembradas posteriormente en el medio ANEL por homogeneización en masa. Destacar que antes de cada inoculación se sacó una muestra de 200 µl del medio de tratamiento para comprobar que la esterilización del medio fue correcta y no existían supervivientes de la termorresistencia anterior que pudiesen contaminar las muestras.

### 3.3.- Recuento de colonias

Para determinar el número de supervivientes de las muestras sembradas en superficie con “spots”, se contaron manualmente las diluciones que contenían entre 5 y 50 colonias. El número de UFC de las placas sembradas por homogeneización en masa se cuantificó mediante un sistema de análisis de imagen diseñado en la Universidad de Zaragoza, el cual proporciona un recuento fiable entre 30.000 a 300 colonias por placa. Cuando el número de UFC fue menor de 300, se realizó un recuento manual.

### 3.4. Cálculo de los parámetros de resistencia

La fracción de microorganismos supervivientes se calculó como el Log ( $N_t/N_0$ ), donde  $N_0$  indica la concentración de microorganismos (UFC/5 µl o UFC/placa) al inicio del tratamiento (es decir,  $t = 0$ ) y  $N_t$  indica el número de supervivientes (UFC/5 µl o UFC/placa) tras un tiempo de tratamiento ( $t$ ). Para comparar la cinética de inactivación, se elaboraron gráficas de supervivencia, representando en ellas el número de microorganismos supervivientes frente al tiempo de tratamiento aplicado (min). Debido a que las gráficas de supervivencia presentaban un hombro, se utilizó el modelo “log-linear + shoulder” desarrollado por Geeraerd, Herremans y Van Impe (2000) usando el complemento de Excel GinaFit. Esta ecuación permite describir las gráficas de supervivencia con dos parámetros:  $Sl$ , que indica la longitud del hombro (min); y  $Kmax$ , que indica la velocidad de muerte en la fase de caída exponencial ( $\text{min}^{-1}$ ), valor a partir del cual se puede calcular el tiempo necesario para reducir la población una unidad logarítmica en la región lineal:  $2,303/Kmax$ . A partir de los parámetros cinéticos, se calculó el valor  $3D_T$ , es decir, el tiempo necesario para conseguir 3 reducciones logarítmicas. Además, se determinó el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y la raíz del error cuadrático medio (RECM) para evaluar la eficacia del ajuste.

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

### 3.5. Verificación de la ausencia del gen en los mutantes seleccionados

Para comprobar si los mutantes seleccionados poseían el cassette de resistencia a los antibióticos en el gen correcto, se realizó una PCR sobre la región que contenía el gen diana en el mutante correspondiente y en la cepa parental, usando la enzima DreamTaq y los pares de cebadores incluidos en la Tabla 1. Se comparó la longitud de los amplicones con una electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

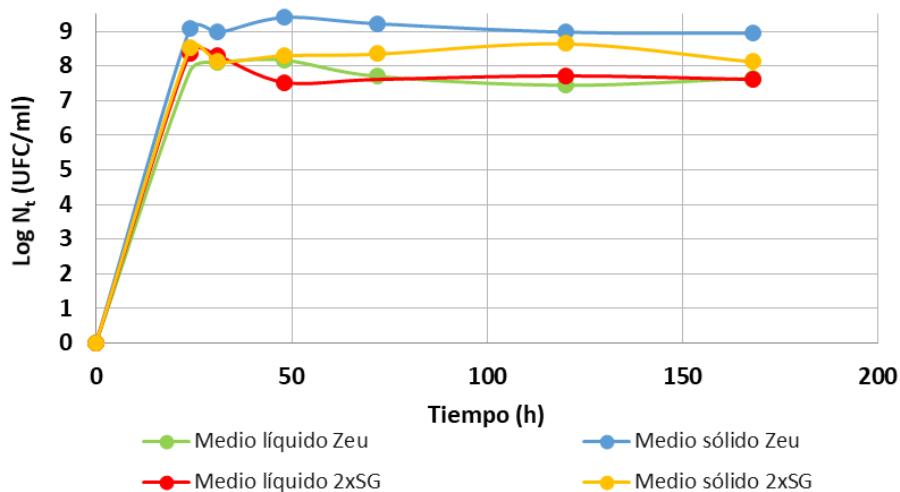
Nombre del cebador	Secuencia
pbuE_168_Fw	TTGAGGGTGCTACCAGGA
pbuE_168_Rev	GGTTGACTACACATCGACA
ydaO_168_Fw	AGAGCAAGACACTGATGGAT
ydaO_168_Rev	CGTTTCACCAGCAGAATTG
yddG_168_Fw	CGTGTGCTAACGCAAAGA
yddG_168_Rev	TTCCACTTCCGGCGCAATT

*Tabla 1. Cebadores utilizados para identificar los mutantes seleccionados.*

## **4.- Resultados y discusión**

### 4.1.- Optimización del método de esporulación

Antes de la obtención de los esporos requeridos en este estudio, se llevaron a cabo distintas pruebas para elegir el medio de esporulación y tiempo de incubación óptimo para obtener el máximo número posible de esporos y minimizar el número de células vegetativas restantes. Para ello, se utilizaron dos medios, Zeu y 2xSG, en estado líquido y sólido, y se determinó el recuento de esporos a lo largo del tiempo de incubación (Figura 4).



*Figura 4. Curva de esporulación de la cepa WT de *B. subtilis* 168 en distintos medios de esporulación. Se representa la concentración de esporos obtenida por recuento en placa tras aplicar un tratamiento de pasteurización.*

La mayor concentración de esporos, a cualquier tiempo de esporulación, se obtuvo en el medio sólido Zeu. En el medio sólido 2xSG, se alcanzó casi el mismo número de esporos que en el medio sólido Zeu tras 120 h de incubación. Estos cultivos contenían una gran cantidad de células vegetativas que no llegaron a esporular, las cuales impiden una sencilla purificación y limpieza de los esporos de interés, mientras que en el medio Zeu solo se observaban restos celulares entre las 48 h y 72 h de incubación.

En el medio líquido 2xSG se obtuvo el mismo recuento de esporos que en el mismo medio en estado sólido a las 24 h, sin embargo, al prolongar el tiempo de incubación, el número de esporos se redujo hasta un 10,2% (192 h), probablemente debido a la regerminación de los esporos. De hecho, el número de células vegetativas se incrementó a lo largo del tiempo de esporulación. En el medio líquido Zeu, no se observaron cambios notables en el recuento de esporos y células vegetativas entre las 48h y 192 h, por lo que no hubo regerminación, pero el número de esporos obtenidos fue inferior al conseguido en el medio sólido.

Para continuar el estudio, se optó por usar el medio sólido Zeu, donde se obtuvo el mayor rendimiento de esporulación, y las placas se incubaron hasta las 72 h para facilitar el desarrollo y maduración (etapa en la que alcanzan la máxima resistencia al calor) de los esporos.

#### 4.2.- Optimización del tratamiento térmico para el cribado de los mutantes

Para establecer el tiempo de tratamiento óptimo a 100°C para comparar la resistencia de los mutantes y la cepa WT, se obtuvo la gráfica de supervivencia de la cepa de referencia (WT) a esta temperatura. Para evaluar si la termorresistencia de los esporos de la cepa parental obtenidos en distintos días podía variar, se evaluó la cinética de inactivación de las tres suspensiones de la cepa WT obtenidas en los tres lotes de esporulación realizados. Éstas se denominaron WT<sub>1</sub>, WT<sub>2</sub> y WT<sub>3</sub> para el lote de esporulación 1, 2 y 3, respectivamente.

Como puede observarse en la Figura 5, a pesar de tratarse de la misma cepa y que se reprodujeron las mismas condiciones de cultivo, se observaron variaciones significativas entre las tres suspensiones. El tiempo de tratamiento para alcanzar 2 ciclos de inactivación variaba de 4,5 a 6,0 min. Como consecuencia, se tuvo que emplear un tiempo distinto de tratamiento para hacer el cribado de los mutantes en cada lote de esporulación (4,5 min en el lote 1, 5,0 min en el lote 2 y 6,0 min en el lote 3); y para comparar la cinética de inactivación de los mutantes sensibles y resistentes se tuvo que utilizar la suspensión de la cepa WT correspondiente a sus lotes de esporulación.

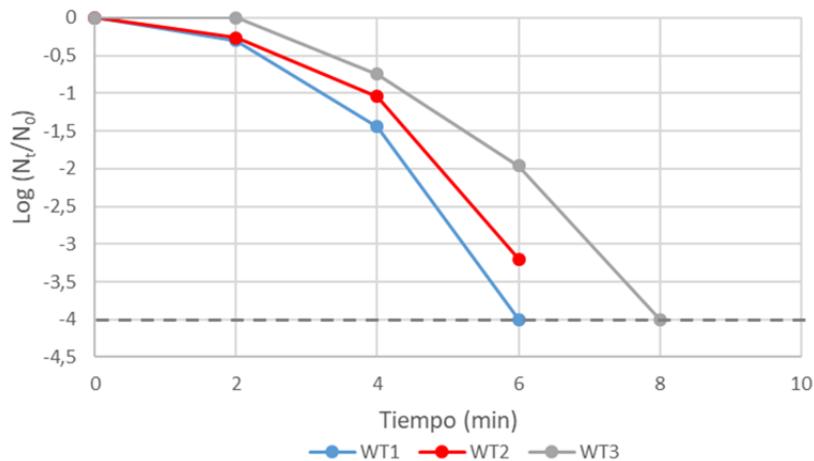
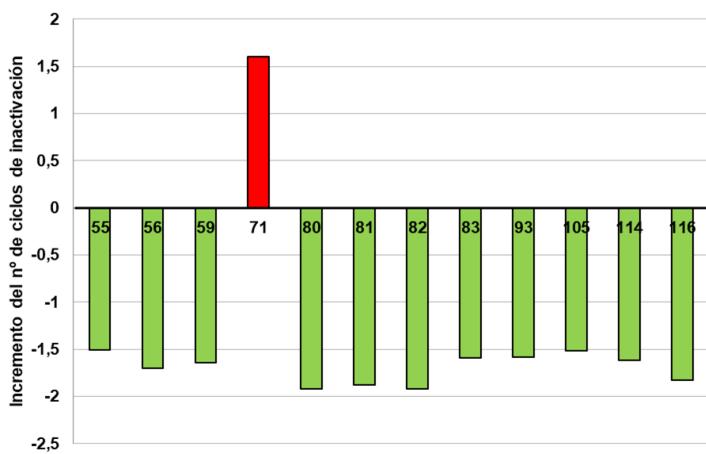


Figura 5. Gráfica de supervivencia a 100°C de los esporos de la cepa WT obtenidos en cada lote de esporulación. La línea discontinua indica el límite de cuantificación.

#### 4.3.- Cribado de los mutantes por su resistencia al calor

Se comparó la fracción de supervivientes de un total de 119 mutantes con su correspondiente cepa parental frente a un tratamiento de 100°C durante 4,5 - 6,0 min. A cada mutante se le asignó un número del 1 al 119 de acuerdo a su posición en la colección. Para calcular la fracción de supervivientes de cada cepa, se determinó la concentración de esporos antes del tratamiento, lo que permitió evaluar el rendimiento de esporulación de cada una. De las 119 suspensiones de mutantes, 5 (4%) de ellas presentaron una concentración de esporos de 2 o más unidades logarítmicas inferior a la de la cepa WT. La resistencia de estos mutantes no pudo ser evaluada.

Se decidió clasificar como resistentes o sensibles aquellos mutantes cuya inactivación fuera 1,5 ciclos logarítmicos superior o inferior en función a la cepa parental correspondiente a cada lote. En la Figura 6 se representa la diferencia en ciclos de inactivación de cada mutante identificado como resistente o sensible respecto a la cepa WT, de forma que los números en positivo indican el número de unidades logarítmicas que es más resistente, y los números en negativo, el número de unidades logarítmicas que es más sensible. De los 119 mutantes estudiados, solo uno fue notablemente más termorresistente que la cepa parental (71), mientras que 11 mutantes fueron más sensibles (55, 56, 59, 80, 81, 82, 83, 93, 105, 114, 116).



*Figura 6. Diferencia de ciclos de inactivación entre cada mutante y su correspondiente cepa parental tras aplicar un tratamiento de 100°C durante 4,5 - 6,0 min.*

#### 4.4.- Confirmación de los cambios de resistencia al calor e identificación de los mutantes seleccionados

Para confirmar que los mutantes inicialmente identificados como resistentes o sensibles lo eran realmente, se estudió su cinética de inactivación en un termorresistómetro a 100°C durante 9 min. Los resultados se presentan en la Figura 8, donde se puede comparar la gráfica de supervivencia de cada mutante con su correspondiente cepa parental, WT<sub>2</sub> (Fig. 7A) o WT<sub>3</sub> (Fig. 7B).

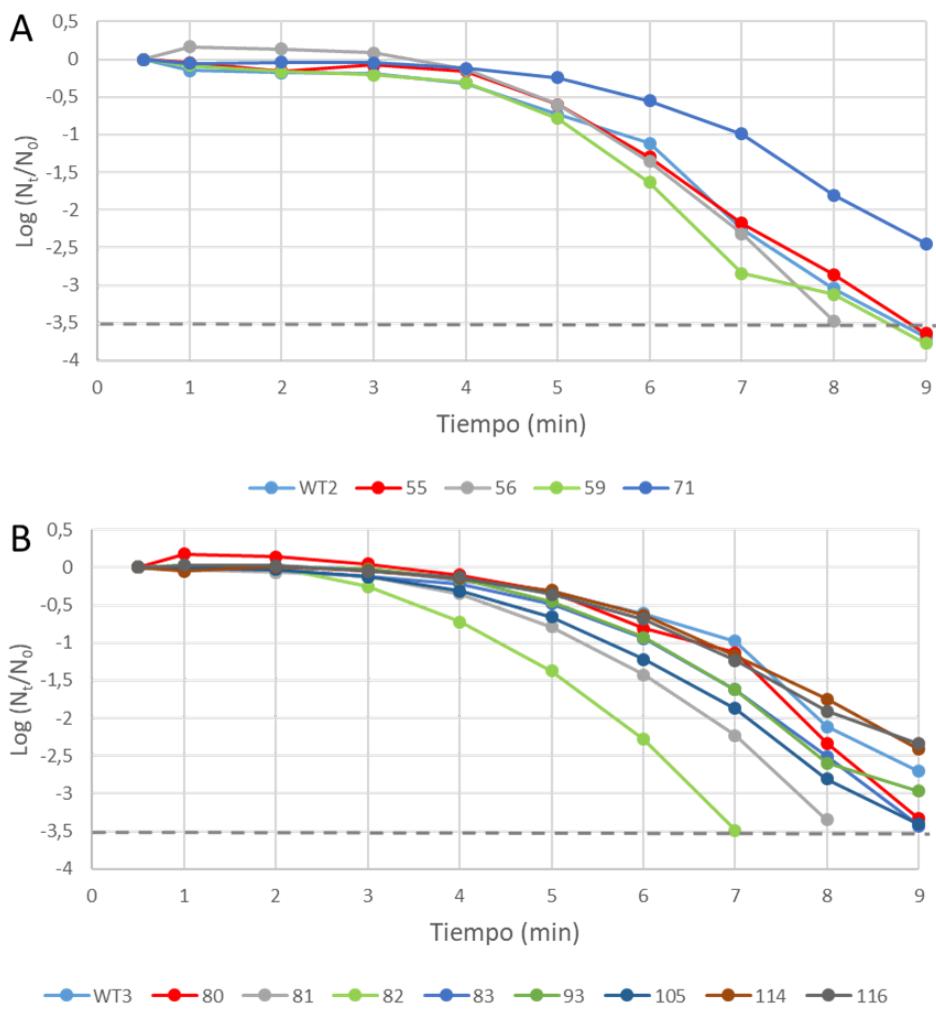


Figura 7. Gráfica de supervivencia a 100°C de los mutantes identificados como resistentes o sensibles en el cribado obtenidas con el termorresistómetro. La figura A incluye las gráficas de los mutantes seleccionados del segundo lote de esporulación, con su correspondiente WT<sub>2</sub>, mientras que la figura B, incluye los mutantes seleccionados del tercer lote de esporulación, con su correspondiente WT<sub>3</sub>. La línea punteada indica el límite de cuantificación.

La Figura 7A confirma que el mutante 71 fue el único mutante identificado con mayor resistencia al calor que la cepa parental. En cuanto a los 11 mutantes inicialmente seleccionados por su mayor sensibilidad al calor, solo se pudo confirmar que los mutantes 81 y 82 eran significativamente más sensibles que la cepa parental (Figura 7B). A los 8 min de tratamiento, ambos mutantes presentaron una fracción de supervivientes igual o inferior a -3,5 unidades logarítmicas (límite de cuantificación), mientras que la supervivencia de la cepa WT a este mismo tiempo se reducía 2 unidades logarítmicas. La razón por la que el resto de los mutantes inicialmente identificados como sensibles mostraron una cinética de inactivación similar o ligeramente más rápida que la de su correspondiente cepa WT se desconoce, aunque se cree que puede estar relacionado

con las diferencias en el sistema de calentamiento empleado en el cribado y la confirmación, ya que en la PCR el calentamiento no es instantáneo y pueden presentarse variaciones en la temperatura.

El mutante más resistente (71) presentaba la delección del gen *pbuE* (con genotipo *pbuE::erm*), mientras que los mutantes sensibles, 81 y 82, carecían de los genes *kimA* (con genotipo *kimA::erm*) y *conG* (con genotipo *conG::erm*), respectivamente. Para confirmar que estos mutantes presentaban el cassette de resistencia a antibióticos reemplazando el gen correcto, se realizó una PCR con cebadores que flanquean la región correspondiente a cada gen y se comparó la longitud de los amplicones. Como se muestra en la Figura 8, todos los mutantes presentaban un amplicón de longitud superior o inferior al de la cepa WT.

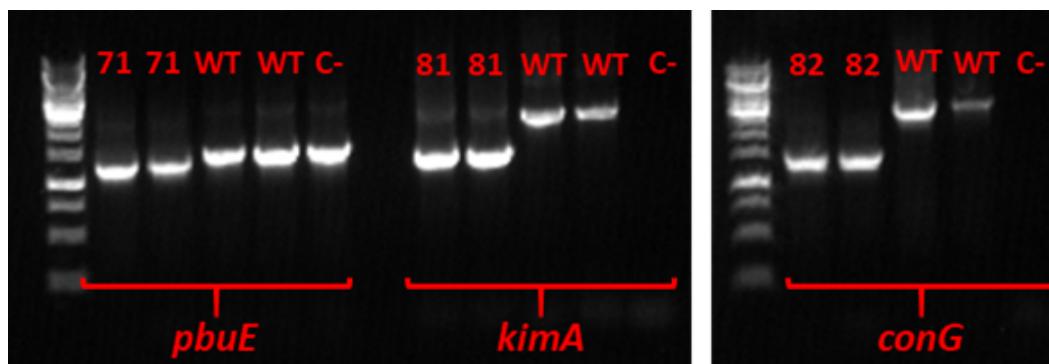


Figura 8. Imagen del gel de electroforesis realizado para comparar la longitud de los fragmentos de PCR y por tanto la inserción correcta del cassette de resistencia a antibióticos (*erm*). Longitud del gen *pbuE*: 1167 pb; longitud del gen *kimA*: 1824 pb; longitud del gen *conG*: 2448 pb; longitud del gen *erm*: 865 pb; C-: control negativo (sin muestra). En el C- de la PCR realizada para amplificar *pbuE* apareció una banda de longitud similar a la de la cepa WT, que probablemente proceda de la contaminación del tubo de PCR o la muestra preparada para la electroforesis.

El gen *pbuE* codifica un exportador de hipoxantina putativo (Pedreira T, Elfmann C y Stülke J, 2022), que está localizado en la membrana citoplasmática y que se encarga de transportar residuos del catabolismo de purinas hacia el exterior, cuya acumulación presentaría toxicidad para las células (Sergey et al., 2005). El gen *kimA* codifica un simporter de K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> de alta afinidad localizado en la membrana citoplasmática (Pedreira T, Elfmann C y Stülke J, 2022), que junto a otros transportadores de iones, resulta esencial para mantener la homeostasis del potasio. La delección de este gen, junto con otros transportadores como KtrAB, limita el contenido de K<sup>+</sup> intracelular adecuado para mantener la viabilidad y la multiplicación (Gundlach, 2017). El K<sup>+</sup> es necesario para el mantenimiento del pH intracelular, ya que contribuye a tamponar las cargas negativas de los aminoácidos y los grupos fosfato de los ácidos nucleicos. Además, muchas bacterias utilizan la importación de K<sup>+</sup> intracelular para compensar el estrés osmótico exterior. Finalmente, es esencial para la actividad de

muchas enzimas y complejos proteicos como los ribosomas (Gundlach, 2017). El gen *conG* localizado también en la membrana citoplasmática, y forma parte de la maquinaria de conjugación ICEBs1 (Pedreira T, Elfmann C y Stölke J, 2022). ICEBs1 es un elemento integrativo y conjugativo de *B. subtilis* adquirido por transferencia horizontal de genes (Auchtung et al., 2016). Ninguno de los tres genes se había relacionado antes con la resistencia al calor de los esporos de *B. subtilis*.

#### 4.5.- Caracterización de la termorresistencia de los mutantes 71 (*pbuE::erm*) y 82 (*conG::erm*)

Posteriormente, se caracterizó la resistencia al calor a distintas temperaturas (97°C, 100°C y 103°C) de los mutantes que presentaban mayor resistencia o sensibilidad con respecto a la cepa WT (71 y 82). Debido a que las curvas de supervivencia presentaban un hombro, para poder comparar los parámetros cinéticos todas las curvas se ajustaron al modelo “log-linear + shoulder” (Geeraerd et al., 2000). En la Tabla 2 aparecen los parámetros cinéticos (*SI* y *Kmax*) obtenidos para cada temperatura y cepa, tanto de los mutantes 71 (*pbuE::erm*) y 82 (*conG::erm*) como de sus cepas parentales correspondientes, *WT<sub>2</sub>* y *WT<sub>3</sub>*. A mayor sea el valor del hombro (*SI*), mayor será la termorresistencia del microorganismo, mientras que a menor sea el valor de *Kmax*, que representa la pendiente de la región exponencial, mayor será la termorresistencia. A partir de estos datos, se calculó el tiempo para alcanzar tres reducciones logarítmicas (3D<sub>T</sub>).

*Tabla 2. Parámetros cinéticos (SI y Kmax) y valores 3D<sub>T</sub> obtenidos tras el ajuste de las gráficas de supervivencia de las cepas indicadas a distintas temperaturas al modelo “log-linear + shoulder” (Geeraerd et al., 2000). La tabla también incluye los valores z calculados a partir de la pendiente de la región lineal. Para comparar la bondad del ajuste, se incluyen la RECM y el R<sup>2</sup>.*

Cepa	Temperatura (°C)	SI (min)	Kmax (min <sup>-1</sup> )	RECM	R <sup>2</sup>	3D <sub>T</sub> (min)	z (°C)	R <sup>2</sup>
<i>WT<sub>2</sub></i>	97	4,53	1,34	0,063	0,998	9,70	8,61	0,901
	100	4,56	1,88	0,126	0,993	8,23		
	103	1,13	6,65	0,269	0,970	2,17		
71	97	4,33	1,05	0,113	0,995	10,91	9,69	0,9716
	100	5,99	1,73	0,178	0,963	9,98		
	103	0,79	4,37	0,536	0,895	2,38		
<i>WT<sub>3</sub></i>	97	6,08	1,47	0,111	0,991	10,79	9,84	0,8801
	100	5,86	1,89	0,230	0,953	9,51		
	103	1,05	5,98	0,131	0,992	2,21		
82	97	3,83	1,52	0,065	0,999	8,37	9,80	0,8915

	100	3,31	2,01	0,137	0,994	6,75		
	103	0,79	6,23	0,321	0,969	1,90		

Comparando los valores  $3D_T$  de la cepa  $WT_2$  y el mutante 71 puede observarse que existe una mayor diferencia entre ellos a  $97^\circ\text{C}$ , y que esta diferencia se hace más pequeña al aumentar la temperatura de tratamiento. La mayor resistencia del mutante 71, especialmente a las temperaturas más bajas, se puede atribuir principalmente a un menor valor de  $K_{max}$  con respecto a la cepa parental. De hecho, al representar el logaritmo del tiempo necesario para reducir la población a la décima parte de la región lineal (el valor  $D$  tradicional) respecto a la temperatura, es decir la gráfica de termodestrucción (Figura 9), el valor  $z$  (número de grados que es necesario aumentar la temperatura para reducir el valor  $D$  a la décima parte) era superior en el mutante que en la cepa  $WT$ .

Entre la  $WT_3$  y el mutante 82, también se observó que la diferencia entre sus valores  $3D_T$  se reducía con la temperatura de tratamiento. En este caso, los valores de  $K_{max}$  de las dos cepas fueron prácticamente similares a todas las temperaturas, y por tanto mostraron un valor  $z$  similar (Tabla 2, Figura 9). La mayor sensibilidad del mutante 82 se debía a una menor longitud del hombro que en la cepa parental, indicando que el gen *conG* podría ser importante para la acumulación o reparación de daños.

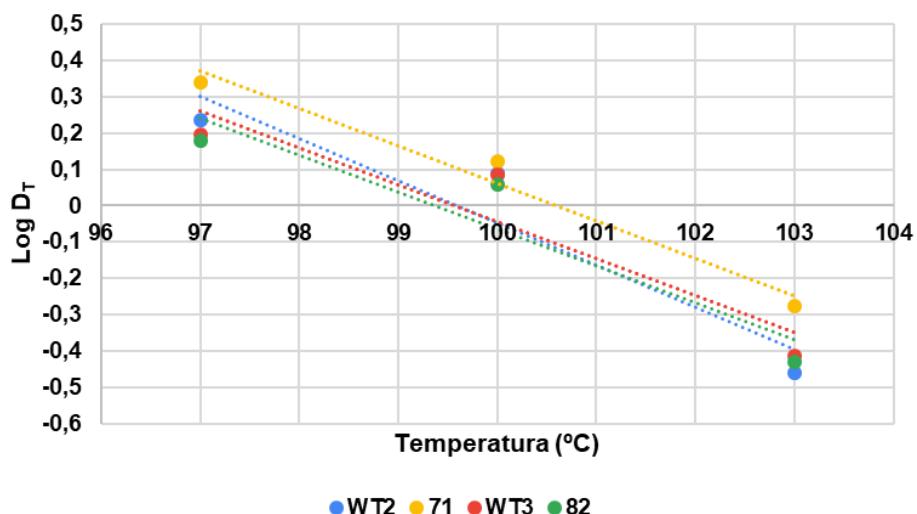


Figura 9. Gráfica de termodestrucción de las cepas indicadas. El valor  $D_T$  se calculó de la región lineal de las gráficas de supervivencia.

## 5.- Conclusiones

- 1.- El medio de esporulación óptimo para obtener el máximo rendimiento de esporulación con la mínima proporción de células vegetativas que no llegaban a esporular o que regerminaban fue el medio sólido Zeu. Este medio permitía obtener, con tan solo dos placas

de cultivo y realizando lavados con solo agua destilada, una suspensión de esporos con una alta concentración y muy pura (> 95% esporos). Esto permitía realizar lotes de esporulación grandes, de unas 30 - 40 cepas.

2.- La resistencia de la cepa parental a 100°C variaba entre los distintos lotes de esporulación, aunque se utilizará el mismo medio y mismas condiciones de cultivo. Esto obligaba a ajustar el tiempo de tratamiento para realizar el cribado de los mutantes resistentes y sensibles en cada lote de esporulación.

3.- Un 4% de los 119 mutantes utilizados mostraron un rendimiento de esporulación deficiente, dos más unidades logarítmicas inferior a la de la cepa parental. Debido a la baja concentración de esporos formados por estos mutantes, no se pudo estudiar su resistencia al calor.

4.- De los 119 mutantes cribados por su resistencia al calor a 100°C, inicialmente se identificaron 11 mutantes sensibles y 1 resistente. La obtención de la curva de supervivencia a la misma temperatura solo confirmó que dos de ellos eran significativamente más sensibles que la cepa parental, y uno más resistente. Estos resultados indican que el método de cribado utilizado sobreestima el número de mutantes sensibles al calor, o que la resistencia de los mutantes varía con el sistema de calentamiento empleado: el cribado se hizo en una máquina de PCR a punto final y la confirmación a través de una curva de supervivencia en un termorresistómetro. Por tanto, resulta necesario optimizar tanto el método de cribado como el de confirmación para evitar pasar por alto la identificación de mutantes sensibles o resistentes.

5.- El mutante identificado como resistente (71) presentaba la delección del gen *pbuE* (con genotipo *pbuE::erm*), cuya proteína se localiza en la membrana citoplasmática y se encarga de exportar hipoxantina durante el catabolismo de los nucleótidos. Este gen no se había relacionado anteriormente con la resistencia al calor. La diferencia en resistencia al calor entre este mutante y la cepa parental era mayor cuanto menor era la temperatura de tratamiento, y se atribuía principalmente a un menor valor de *Kmax*. De hecho, el valor *z* (calculado a partir del valor de la región lineal) era superior en el mutante que en la cepa WT.

6.- Los mutantes sensibles (81 y 82) carecían de los genes *kimA* (con genotipo *kimA::erm*) y *conG* (con genotipo *conG::erm*), respectivamente. Ninguno de los dos genes se había relacionado anteriormente con la resistencia al calor. *KimA* se localiza en la membrana citoplasmática y actúa como un transportador de potasio de alta afinidad. *ConG* se localiza también en la membrana citoplasmática, y forma parte de la maquinaria de conjugación ICEBs1. Este último mutante fue el más sensible. Las diferencias en resistencia con la cepa

parental fueron mayores cuanto menor era la temperatura de tratamiento, y se debían principalmente a una reducción en la longitud del hombro de las gráficas de supervivencia, y por tanto en la capacidad de acumulación o reparación de los daños térmicos.

## Conclusions

- 1.- The optimal sporulation medium to obtain the maximum sporulation yield with the minimum proportion of vegetative cells that failed to sporulate or regerminate was the Zeu solid medium. This medium made it possible to obtain, with only two culture plates and by washing with only distilled water, a highly concentrated and very pure spore suspension (>95% spores). This allowed for large sporulation batches of 30-40 strains.
- 2.- The resistance of the parental strain at 100°C varied between sporulation batches, even though the same medium and culture conditions will be used. This made it necessary to adjust the treatment time to screen for resistant and sensitive mutants in each sporulation batch.
- 3.- 4% of the 119 mutants used showed a poor sporulation performance, two more log units lower than that of the parental strain. Due to the low concentration of spores formed by these mutants, their heat resistance could not be studied.
- 4.- Of the 119 mutants screened for heat resistance at 100°C, 11 sensitive mutants and 1 resistant mutant were initially identified. Obtaining the survival curve at the same temperature only confirmed that two of them were significantly more sensitive than the parental strain, and one more resistant. These results indicate that the screening method used overestimates the number of heat-sensitive mutants, or that the resistance of the mutants varies with the heating system used: screening was done in an end-point PCR machine and confirmation through a survival curve in a thermoresistor. It is therefore necessary to optimise both the screening and confirmation methods to avoid overlooking the identification of sensitive or resistant mutants.
- 5.- The mutant identified as resistant (71) had a deletion of the *pbuE* gene (with genotype *pbuE::erm*), whose protein is located in the cytoplasmic membrane and is responsible for exporting hypoxanthine during nucleotide catabolism. This gene has not previously been linked to heat resistance. The difference in heat resistance between this mutant and the parental strain was greater the lower the treatment temperature, and was mainly attributed to a lower *Kmax* value. In fact, the z-value (calculated from the linear region value) was higher in the mutant than in the WT strain.

**6.-** Sensitive mutants (81 and 82) lacked the *kimA* (with *kimA::erm* genotype) and *conG* (with *conG::erm* genotype) genes, respectively. Neither gene had previously been linked to heat resistance. *KimA* is located in the cytoplasmic membrane and acts as a high-affinity potassium transporter. *ConG* is also located in the cytoplasmic membrane, and is part of the ICEBs1 conjugation machinery. The latter mutant was the most sensitive. Differences in resistance with the parental strain were greater the lower the treatment temperature, and were mainly due to a reduction in the shoulder length of the survival graphs, and thus in the ability to accumulate or repair thermal damage.

## **6.- Valoración personal**

El Trabajo de Fin de Grado ha supuesto el mayor proyecto al que me he involucrado a día de hoy, exigiendo y permitiéndome aplicar todas aquellas competencias que he ido desarrollando a lo largo de la carrera; además, he aprendido a utilizar otros aparatos de laboratorio como el termorresistómetro.

El poder trabajar con una bacteria esporulada , *Bacillus subtilis*, de la cual conocemos todo su genoma lo que nos permite modificar qué genes queremos que se expresen ha sido muy interesante, ya que he podido observar como la delección de un gen puede influir sobre las distintas características del esporo, aunque en este trabajo solo haya podido estudiarse la influencia sobre la resistencia al calor. Si en un futuro tengo la posibilidad, me interesaría poder estudiar como los mutantes con los que hemos trabajado influyen sobre otras características.

Ha sido un trabajo intenso y exigente al cual le he tenido que dedicar muchas horas, sin embargo el laboratorio es un entorno en el que me siento cómoda trabajando a pesar de que haya habido momentos en los que las horas de trabajo dedicadas hayan dado como resultado datos no útiles en la investigación, pero forma parte de la experiencia.

Para finalizar, me gustaría agradecer a mis tutores del proyecto, en especial a Elisa Gayán que ha dedicado gran parte de su tiempo a mi formación y que este trabajo fuese posible; querría agradecer también a mis compañeros de laboratorio su paciencia conmigo por enseñarme y guiarme cuando me encontraba algo perdida. Agradecimientos a mis amigos y familiares por estar siempre ahí.

## **7.- Bibliografía**

Abel-Santos, E. (2015). "Chapter 9 - Endospores, Sporulation and Germination" Editors: Yi - Wei Tang, Max Sussman, Dongyou Liu, Ian Poxton, Joseph Schwartzman, *Molecular Medical*

*Microbiology* (Second Edition), Academic Press, pp. 163-178. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00009-3>.

Abhyankar, W. R., Kamphorst, K., Swarge, B. N., van Veen, H., van der Wel, N. N., Brul, S., de Koster, C. G., de Koning, L. J. (2016). "The Influence of Sporulation Conditions on the Spore Coat Protein Composition of *Bacillus subtilis* Spores". *Front Microbiol*, 13(7), pp. 1636. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01636.

Auchtung, JM., Aleksanyan, N., Bulku, A., Berkmen, MB., (2016). "Biology of ICEBs1, an integrative and conjugative element in *Bacillus subtilis*". *Plasmid*, DOI: 10.1016/j.plasmid.2016.07.001.

Baril, E., Coroller, L., Couvert, O., Leguérinel, 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), pp. 29–36. DOI: 10.1016/j.fm.2011.09.017

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. y Singh, Y., (2008). "Properties of *Bacillus anthracis* spores prepared under various environmental conditions". *Archives of Microbiology*, 189(1), pp. 71–79. DOI: 10.1007/s00203-007-0295-9

Beaman, T. C., Gerhardt, P. (1986). "Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization, and thermal adaptation". *Appl Environ Microbiol*, 52(6), pp. 1242-6. DOI: 10.1128/aem.52.6.1242-1246.

Beaman, TC., Greenamyre, JT., Corner, TR., Pankratz, HS., Gerhardt, P., (1982). "Bacterial spore heat resistance correlated with water content, wet density, and protoplast/sporoplast volume ratio". *Journal of Bacteriology*, 150(2), pp. 870-7. DOI: 10.1128/jb.150.2.870-877.1982.

Berendsen, E., Boekhorst, J., Kuipers, O. et al. (2016). "A mobile genetic element profoundly increases heat resistance of bacterial spores". *ISME J*, 10, pp. 2633–2642 DOI: [doi.org/10.1038/ismej.2016.59](https://doi.org/10.1038/ismej.2016.59)

Bressuire-Isoard, C., Broussolle, V. y Carlin, F., (2018). "Sporulation environment influences spore properties in *Bacillus*: evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms". *FEMS Microbiology Reviews*, 42(5), pp. 614–626. DOI: 10.1093/femsre/fuy021

Castañeda, F., García, L., Oaxaca, C., Arciga, R., del Carmen Sabino, M. "Evaluación de la capacidad de reducción de la carga microbiana de un sistema de intercambiadores de calor concéntricos, aplicados en un proceso de secado por aspersión de alimentos." In *Ciencias Naturales y Exactas Handbook T-II: Congreso Interdisciplinario de Cuerpos Académicos*. (2014). ECORFAN, pp. 152-162.

Chan, H., Taib, N., Gilmore, M. C., Mohamed, A. M. T., Hanna, K., Luhur, J., Nguyen, H., Hafiz, E., Cava, F., Gribaldo, S., Rudner, D., Rodrigues, C. D. A. (2022). "Genetic Screens Identify Additional Genes Implicated in Envelope Remodeling during the Engulfment Stage of *Bacillus subtilis* Sporulation". *mBio*, 13(5). DOI: [10.1128/mbio.01732-22](https://doi.org/10.1128/mbio.01732-22)

Coleman, W. H., Setlow, P. (2009). "Analysis of damage due to moist heat treatment of spores of *Bacillus subtilis*". *Journal of applied microbiology*, 106(5), pp. 1600–1607. DOI: [10.1111/j.1365-2672.2008.04127.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04127.x).

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(4), pp. 357-366. DOI: [10.1016/0167-7012\(93\)90017-C](https://doi.org/10.1016/0167-7012(93)90017-C)

Cruz Mora, J. (2016). *Papel de las proteínas de germinación en esporas de Bacillus subtilis*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Guerrero.

Durand, L., Planchon, S., Guinebretiere, M., Carlin, F., Remize, F. (2015). "Genotypic and phenotypic characterization of foodborne *Geobacillus stearothermophilus*". *Food Microbiology*, 45(A), pp. 103-110. DOI: [10.1016/j.fm.2014.01.015](https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.01.015).

EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards). (2016). "Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs". *EFSA Journal*, 14(7), pp. 4524-93 DOI: [10.2903/j.efsa.2016.4524](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4524)

European Food Safety Authority (EFSA) (2005). "Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) related to *Clostridium* spp in foodstuffs: Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) related to *Clostridium* spp in foodstuffs" *EFSA journal*, 3(4), pp. 199. DOI: [10.2903/j.efsa.2005.199](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2005.199).

Freire, V., Del Río, J., Gómara, P., Salvador, M., Condón, S., Gayán, E., (2023). "Comparative study on the impact of equally stressful environmental sporulation conditions on thermal inactivation kinetics of *B. subtilis* spores". *Int Journal of Food Microbiology*, 16, pp 405. DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110349](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110349).

Gayán, E., Álvarez, I., Condón, S. (2013). "Inactivation of bacterial spores by UV-C light". *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19, pp. 140-145. DOI: [10.1016/j.ifset.2013.04.007](https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.04.007)

Ghosh, S., Setlow, B., Wahome, P. G., Cowan, A. E., Plomo, M., Malkin A. J., Setlow, P. (2008). "Characterization of Spores of *Bacillus subtilis* That Lack Most Coat Layers". *Journal of Bacteriology*, 190(20), pp. 6741-6748. DOI: [10.1128/jb.00896-08](https://doi.org/10.1128/jb.00896-08)

Gronskiy, S., Zakataeva, N., Vitushkina, M., Ptitsyn, L., Altman, I., Novikova, E., Livshits, V. (2005). "The *yicM* (*nepI*) gene of *Escherichia coli* encodes a major facilitator superfamily protein

involved in efflux of purine ribonucleosides". *FEMS Microbiology Letters*, 250(1), pp. 39–47, DOI: [10.1016/j.femsle.2005.06.051](https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.06.051)

Gundlach, J., Herzberg, C., Hertel, D., Thürmer, A., Daniel, R., Link, H., Stölke, J. (2017). "Adaptation of *Bacillus subtilis* to Life at Extreme Potassium Limitation". *mBio*, 8(4). DOI: [10.1128/mbio.00861-17](https://doi.org/10.1128/mbio.00861-17).

Iáñez, E. (2006). Diferenciaciones celulares | Universidad de Granada. Disponible en: [https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/09esporas.htm#\\_Toc57039377](https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/09esporas.htm#_Toc57039377)

Koo, B. M., Kritikos, G., Farelli, J. D., Todor, H., Tong, K., Kimsey, H., Wapinski, I., Galardini, M., Cabal, A., Peters, J. M., Hachmann, A. B., Rudner, D. Z., Allen, K. N., Typas, A., Gross, C. A. (2017). "Construction and Analysis of Two Genome-Scale Deletion Libraries for *Bacillus subtilis*". *Cell Syst*, 4(3), pp. 291-305. doi: [10.1016/j.cels.2016.12.013](https://doi.org/10.1016/j.cels.2016.12.013).

Korza, G., DePratti, S., Fairchild, D., Wicander, J., Kanaan, J., Shames, H., Nichols, F. C., Cowan, A., Brul, S., Setlow, P. (2023). "Expression of the 2Duf protein in wild-type *Bacillus subtilis* spores stabilizes inner membrane proteins and increases spore resistance to wet heat and hydrogen peroxide." *Journal of Applied Microbiology*, 134(3). DOI: [10.1093/jam bio/lxad040](https://doi.org/10.1093/jam bio/lxad040)

Luu, S., Cruz-Mora J., Setlow, B., Feeherry, F. E., Doona, C. J., Setlow, P. (2015). "The effects of heat activation on *Bacillus* spore germination, with nutrients or under high pressure, with or without various germination proteins". *Appl Environ Microbiol*, 81(8), pp. 2927-38. DOI: [10.1128/AEM.00193-15](https://doi.org/10.1128/AEM.00193-15).

Moir, A. y Cooper, G. (2015). "Spore germination". *Microbiology spectrum*, 3(6). DOI: [10.1128/microbiolspec.TBS-0014-2012](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0014-2012).

Nguyen Thi Minh, H., Durand, A., Loison, P., Gervais, P. (2011). "Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, pp. 1409–1417. DOI: [10.1007/s00253-011-3183-9](https://doi.org/10.1007/s00253-011-3183-9)

Ogasawara, N. (2000). "Systematic function analysis of *Bacillus subtilis* genes". *Research in microbiology*, 151(2), pp. 129–134. DOI: [10.1016/s0923-2508\(00\)00118-2](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(00)00118-2).

Pedreira, T., Elfmann, C., Stölke, J. (2022) "The current state of SubtiWiki, the database for the model organism *Bacillus subtilis*" *Nucleic Acids Research*, 50(D1), p. D875–D882. DOI: [10.1093/nar/gkab943](https://doi.org/10.1093/nar/gkab943)

Rodríguez Lancharro, M. (2019). *Spo0a: Más allá de la esporulación en Bacillus*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Sevilla.

Ros-Chumillas, M., Esteban, M., Huertas, J., Palop, A. (2015). "Effect of Nisin and Thermal Treatments on the Heat Resistance of *Clostridium sporogenes* Spores". *Journal of Food Protection*, 78(11), pp. 2019-2023. DOI: [10.4315/0362-028X.JFP-15-083](https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-083).

Ruiz Artiga, V. (2021). *Estudios sobre la inactivación, activación y germinación de especies esporuladas de interés en alimentos*. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.

Ruiz, V., Alonso, R., Mañas, P., Condón, S., Condón-Abanto, S. (2022). "Geobacillus stearothermophilus STCC4517 spore suspensions showed survival curves with shoulder phenomena independent of sporulation temperature and pH, whose duration was an exponential function of treatment temperature". *Food Microbiology*, 104. DOI: [10.1016/j.fm.2021.103969](https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103969)

Sanchez-Salas, J.-L., Setlow, B., Zhang, P., Li, Y., 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(19), pp. 6746–6754. DOI: 10.1128/AEM.05031-11

Sayer, C. V., Barat, B., Popham, D. L. (2019). "Identification of L-Valine-initiated-germination-active genes in *Bacillus subtilis* using Tn-seq". *PLoS One*, 14(6). DOI: [10.1371/journal.pone.0218220](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218220).

Scoffone, V., Dondi, D., Biino, G., Borghese, G., Pasini, D., Galizzi, A., Calvio, C., (2013). "Knockout of *pgdS* and *ggt* genes improves γ-PGA yield in *B. subtilis*". *Biotechnology and Bioengineering*, 110(7), pp. 2006–2012. DOI: [10.1002/bit.24846](https://doi.org/10.1002/bit.24846)

Segev, E., Smith, Y., Ben-Yehuda, S. (2012). "RNA dynamics in aging bacterial spores", *Cell*, 148(1–2), pp. 139–149. DOI: [10.1016/j.cell.2011.11.059](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.059).

Setlow, P. (2006). "Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals," *Journal of applied microbiology*, 101(3), pp. 514–525. DOI: [10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x).

Setlow, P. (2014). "Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know". *Journal of Bacteriology*, 196(7), pp. 1297-305. DOI: [10.1128/JB.01455-13](https://doi.org/10.1128/JB.01455-13).

Setlow, P., Christie, G. (2021). "What's new and notable in bacterial spore killing!". *World Journal Microbiology Biotechnology*, 37(8), pp. 144. DOI: [10.1007/s11274-021-03108-0](https://doi.org/10.1007/s11274-021-03108-0).

Setlow, P., Johnson E.A., (2019). "Spores and their significance". En: Doyle, M. P., Diez Gonzalez,F., Hill, C. (Coord.). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (5th Ed) ASM Press, Washington, DC. pp.23-62. DOI: [10.1128/9781555819972.ch2](https://doi.org/10.1128/9781555819972.ch2)

Setlow, P., Wang, S., Li, Y. Q. (2017). "Germination of Spores of the Orders Bacillales and Clostridiales". *Annual Reviews Microbiology*, 71, pp. 459-477. DOI: [10.1146/annurev-micro-090816-093558](https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093558).

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(5), pp. 1455-8. DOI: [10.1128/JB.01497-09](https://doi.org/10.1128/JB.01497-09).

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., Abée, T. (2016). "Bacterial Spores in Food: Survival, Emergence, and Outgrowth". *Annual Review of Food Science and Technology*, 7, pp. 457-82. DOI: 10.1146/annurev-food-041715-033144.

Yu, B., Kanaan, J., Shames, H., Wicander, J., Aryal, M., Li, Y., Korza, G., Brul, S., Kramer, G., Li, Y-q., Nichols, F. C., Hao, B., Setlow, P. (2023). "Identification and characterization of new proteins crucial for bacterial spore resistance and germination". *Frontiers in Microbiology*, 14. DOI: [10.3389/fmicb.2023.1161604](https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1161604)