



Trabajo de Fin de Grado

Determinación de la composición elemental de esporas bacterianas mediante ICP-MS en modo de evento individual para el estudio de los procesos de esporulación y germinación de bacterias.

Autora: Irati López Pérez

Directora: María Teresa Aramendía Marzo

Codirector: Antonio Bazo Sánchez

Grado en Química. Departamento de Química Analítica. Grupo MARTE

Zaragoza, junio de 2024

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Bacillus Subtilis.....	1
1.2. Fundamentos de ICP-MS en modo convencional.....	3
1.3. ICP-MS para el análisis de eventos individuales.....	6
1.4. Antecedentes.....	9
2. OBJETIVOS Y ALCANCE DEL TRABAJO.....	10
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	11
3.1. Reactivos y muestras.....	11
3.2. Instrumentación y aparatos.....	12
3.3. Procedimiento para realizar las medidas.....	12
3.3.1 Preparación de las muestras e introducción al ICP-MS.....	12
3.3.2. Análisis y calibración.....	14
3.3.3. Tratamiento de datos.....	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
4.1. Optimización de parámetros instrumentales.....	16
4.1.1. Selección de nucleidos y tiempos de medida.....	16
4.1.2. Optimización del flujo de gases.....	17
4.2. Medida mediante el modo de evento individual.....	18
4.3. Validación mediante el modo convencional.....	20
5. CONCLUSIONES.....	22
REFERENCIAS.....	22
ANEXOS.....	A1

RESUMEN

La necesidad de controlar las esporas bacterianas que resultan de la resistencia de las bacterias a diferentes condiciones (temperatura, salinidad, pH) ha derivado en el estudio de su composición elemental. Dado que los diferentes analitos se encuentren a tan baja concentración, se debe recurrir a técnicas analíticas con las prestaciones analíticas adecuadas (bajos límites de detección y gran rango lineal) como ICP-MS (por sus siglas en inglés *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*). Concretamente, se ha usado SC-ICP-MS (por sus siglas en inglés *Single Cell Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) por la gran ventaja que supone el conocimiento célula a célula para abordar esta situación, siendo esta técnica muy novedosa en este campo de estudio para este propósito.

El objetivo principal de este trabajo es desarrollar un método de análisis que permita caracterizar la composición elemental de las esporas individuales mediante SC-ICP-MS y, tras seleccionar los parámetros adecuados, validarla mediante la medida de las mismas muestras por el modo convencional de ICP-MS. Además, debe determinarse si la utilización de un tampon modifica los resultados obtenidos.

Mediante un ICP-MS NexION 5000 (PerkinElmer, Waltham, MA, EEUU) se han medido diferentes disoluciones para preparar rectas de calibrado conteniendo Mn, Mg, Ca y Zn como los analitos de interés y dos muestras de esporas bacterianas (únicamente una ha seguido un proceso de lavado con tampon).

Se ha observado que para SC-ICP-MS no parece necesario el tampon por la gran dilución aplicada para realizar determinaciones por esta técnica. Por otro lado, para el modo convencional sí parece necesario y mientras que reduce el contenido de Mg y Zn, debe haber una contaminación de Ca puesto que aumenta. Como los resultados obtenidos entre ambos modos atendiendo al Mg y Zn no son significativamente diferentes, se ha conseguido la difícil validación del método desarrollado en este trabajo.

SUMMARY

The need to control the bacterial spores that result from the resistance of bacteria to different conditions (temperature, salinity, pH) has led to the study of their elemental composition. Given that the different analytes are at such low concentrations, analytical techniques with appropriate analytical features (low detection limits and large linear range) such as ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) must be used. Specifically, SC-ICP-MS (Single Cell Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) has been used due to the great advantage of cell-to-cell knowledge to approach this situation, being this technique very novel in this field of study for this purpose.

The main objective of this work is to develop an analysis method that allows characterizing the elemental composition of individual spores using SC-ICP-MS and, after selecting the appropriate parameters, validate it by measuring the same samples by the conventional ICP-MS mode. Furthermore, it must be determined if the use of a buffer modifies the obtained results.

Using an ICP-MS NexION 5000 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA), different solutions have been measured to prepare calibration lines containing Mn, Mg, Ca and Zn as the interest analytes and two samples of bacterial spores (only one has followed a buffer washing process).

It has been observed that for SC-ICP-MS the buffer does not seem necessary due to the large dilution applied to carry out determinations by this technique. On the other hand, for the conventional mode it does seem necessary and while it reduces the amount of Mg and Zn, there must be Ca contamination since it increases.

As the results obtained between both modes considering Mg and Zn are not significantly different, the difficult validation of the developed method in this work has been achieved.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Bacillus Subtilis*

La resistencia a los antibióticos desarrollada por las bacterias, es un tema de gran relevancia en la actualidad dada la problemática que conlleva y que ha supuesto una mayor concienciación en la necesidad del uso correcto de los medicamentos.¹ Estos antibióticos son sustancias, que pueden ser naturales, semisintéticas o sintéticas, capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos que pueden producir diversas patologías en los seres humanos y en los animales.² Sin embargo, la extensión de esta problemática abarca más factores puesto que no sólo soportan la acción de estos antibacterianos,³ sino que se ha detectado resistencia a diversas condiciones de esterilización, que tratan de eliminar toda forma de vida microbiana y sus posibles transformaciones asociadas,⁴ como son la alta temperatura, la salinidad o el pH. Esta resistencia tiene una clara relación en el sector sanitario y veterinario, puesto que cuando los antibióticos no producen el efecto deseado se recurre a opciones más tóxicas y costosas. Sin embargo, esta problemática también afecta a otros campos como el sector alimentario, en el que la incapacidad para combatir la presencia de bacterias puede conllevar el deterioro de los alimentos, pudiendo causar diferentes patologías.²

En pocas palabras, el hecho de que las bacterias soporten mayor cantidad de condiciones ambientales es un gran problema para la sociedad puesto que pueden generarse enfermedades por la ingesta de ciertos alimentos contaminados con ellas, y otras afecciones, incluso las más comunes, no podrán tratarse convenientemente surgiendo complicaciones por el nulo efecto de los antibióticos actuales.¹ Además, esto es incluso más grave en países en vías de desarrollo ya que tienen una inferior capacidad económica para recurrir a tratamientos más caros y al equipamiento necesario.²

En este trabajo se ha utilizado como modelo la bacteria *Bacillus Subtilis*, bacteria Gram positiva,⁵ que es considerada como un organismo generalmente observado como seguro (GRAS), lo que la hace idónea para la investigación en campos como la biotecnología. En este sentido, diferentes estudios realizados sobre esta bacteria y su uso la han relacionado con distintas enfermedades, como la meningitis bacteriana⁶ o la sepsis neonatal,⁷ con su utilización en suplementos alimenticios, como los probióticos,⁸ o el tratamiento frente a diversas toxinas, como la aflatoxina,⁹ entre otros.¹⁰ En la Figura 1 se muestra una imagen de *Bacillus Subtilis* tomada por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

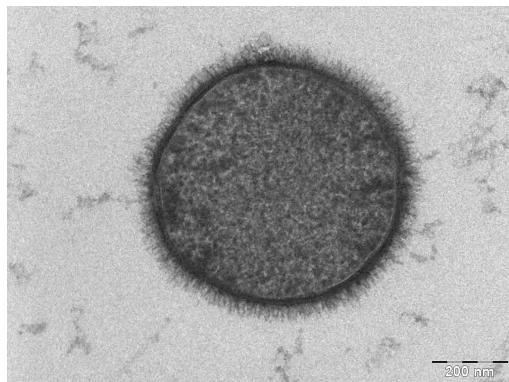


Figura 1. Imagen obtenida por TEM de *Bacillus Subtilis*.¹¹

Uno de los mecanismos defensivos de la *B. Subtilis* para soportar las condiciones adversas anteriormente descritas es la llamada esporulación. Este proceso transformativo supone una restructuración macroscópica en la que la bacteria se vuelve una espora de alta resistencia, pudiendo soportar temperaturas superiores a los 100 °C, procesos de desecación o de radiación y varios agentes bactericidas.^{10, 12}

Esta situación provoca que estas esporas bacterianas sean objeto de estudio puesto que cuando las condiciones se suavizan, estas proliferan, colonizando nuevos entornos y pudiendo esparcir enfermedades.^{13,14}

La esporulación puede atribuirse principalmente a varios aspectos. Uno de ellos es la deshidratación de protoplastos, mediante la cual se produce simultáneamente la rápida eliminación de agua y de la reserva central de Ca²⁺-DPA (i.e. catión calcio y ácido dipicolínico), que protege el núcleo de la espora, seguida del retorno de la fluididad de la membrana y la degradación de la mayoría de la pared de la corteza que permite la reanudación de la actividad metabólica y del crecimiento de esporas por la rehidratación del núcleo.

En cuanto a la adaptación térmica, se ha establecido que parece ser una característica intrínseca de las esporas determinada genéticamente, esto es que las esporas que sean especies termófilas resistirán mejor que aquellas que no lo sean. Sin embargo, también se ha observado que aquellas esporas que crecen a temperaturas superiores son más resistentes y que puede ser un componente extrínseco impuesto sobre el factor genético. De la misma forma que aparentemente la adaptación térmica, la mineralización es también un factor extrínseco de las esporas que contribuye a la resistencia térmica. Este proceso se basa en la desmineralización por extracción ácida de esporas inactivas y remineralización con sales específicas.¹⁵

Debido a las diferentes condiciones comentadas anteriormente que estas esporas pueden soportar, es que resulta tan relevante estudiar la relación existente entre su composición elemental y su condición resistente para poder controlar esta apremiante situación. Para este tipo de análisis es necesario emplear una técnica que cumple con dos condiciones esenciales: en primer lugar, se requiere una gran sensibilidad para poder detectar y cuantificar el contenido de los analitos en cada célula (típicamente de pocos fg) y, además, es necesario poder evaluar las células una a una, pudiendo obtener una distribución en masa que realmente muestre el rango de concentraciones exhibido por las células. Por lo tanto, la espectrometría de masas con ionización en plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS, por sus siglas en inglés *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) resulta la técnica más adecuada para este tipo de análisis, ya que, mediante el modo de evento individual, cumple con ambas condiciones y, adicionalmente, los resultados obtenidos se pueden validar con el valor medio obtenido del análisis en modo convencional de células digeridas. Las diferencias operativas y fundamentales entre estos modos de análisis se discutirán a lo largo de las siguientes secciones.

1.2. Fundamentos de ICP-MS en modo convencional

En este trabajo se ha procedido a hacer uso de ICP-MS como técnica de análisis. Se trata de una de las técnicas analíticas más empleadas en la actualidad para el análisis de rutina a niveles bajos de concentración dadas sus prestaciones analíticas (gran rango lineal y bajos límites de detección),¹⁶ sus posibilidades para el análisis multielemental y el pequeño volumen de muestra requerido. Estas características han permitido la implementación de la técnica en numerosos campos de trabajo como medicina,¹⁷ biología¹⁸ o geoquímica,¹⁹ entre otros.

El proceso de medida de un instrumento de ICP-MS en su configuración más típica con nebulización neumática como sistema de introducción de muestras en estado líquido (usualmente disoluciones acuosas más o menos diluidas), comprende las siguientes etapas que se recogen esquemáticamente en la Figura 2.

i) Introducción de muestra.²⁰ La muestra líquida es aspirada de forma continua, generalmente mediante una bomba peristáltica, hasta llegar a un nebulizador, donde forma un aerosol por contacto con un flujo de gas (**flujo de nebulización**). No obstante, dada la ineficacia del plasma para ionizar completamente gotas grandes, la muestra nebulizada no puede ser directamente transportada al interior del instrumento, por lo que primero recorre una cámara de nebulización, habitualmente ciclónica, donde las gotas de mayor tamaño son

eliminadas por el tubo de desecho. Adicionalmente, durante esta etapa tiene lugar, por lo menos en cierta medida, el secado de las gotas del aerosol (eliminación del disolvente).

ii) Ionización.²¹ Una vez dentro del instrumento, la muestra llega a la antorcha a través de un inyector. Dicha antorcha está compuesta por dos tubos de cuarzo concéntricos a través de los cuales se hacen pasar corrientes de argón (**flujo de Ar plasmógeno y flujo auxiliar**) y entorno a cuyo extremo se encuentra una bobina de inducción de cobre por la que se hace circular una corriente alterna de radiofrecuencias que genera un campo magnético alterno. A continuación, el seno del Ar se siembra con electrones mediante una chispa. Estos electrones son acelerados por el campo inducido y se generan las llamadas corrientes de Eddy (*i.e.* corrientes superficiales circulares de iones y electrones en el seno del flujo de Ar). La colisión entre los iones de Ar y los electrones acelerados libera energía y da lugar a un plasma de acoplamiento inductivo (a temperaturas entre 4000 y 10000 K) que se mantiene gracias a la corriente de radiofrecuencias. La energía del plasma es entonces suficiente para provocar la desolvatación, vaporización, disociación, ionización y excitación del analito, que atraviesa el plasma arrastrado por el gas de nebulización que circula por el inyector.

iii) Transmisión de iones.²² Durante esta etapa, los iones formados en el plasma son transportados hacia el analizador de masas. El objetivo principal es conseguir que esta transmisión sea lo más cuantitativa posible para evitar pérdidas de sensibilidad pero también prevenir la llegada de fotones y especies neutras al detector, así como reducir la temperatura y presión a valores tolerables para el analizador de masas (a presiones de entre 10^{-4} y 10^{-5} torr y temperatura ambiente). Para este propósito, el instrumento dispone de un sistema de conos que funcionan en sintonía con una bomba de vacío turbomolecular, lo que permite reducir la presión y la temperatura, así como un deflector de iones que solo permite el paso de especies cargadas al analizador de masas.

iv) Selección de iones.^{23,24} La separación de los iones en función de su relación masa - carga (**m/z**) se consigue mediante el uso de un analizador de masas. En general, los más empleados son los cuadrupolos (Q), donde se ajusta un campo electrostático para que solo los iones de interés sean capaces de atravesarlo, pero también existen otros sistemas. En concreto, durante este trabajo se ha utilizado un instrumento de triple cuadrupolo, donde uno de los cuadrupolos adicionales hace las veces de celda de colisión y/o reacción, para eliminar interferencias espectroscópicas (*i.e.* aquellas especies iónicas que posean una relación m/z similar a la del analito), mientras que el otro es un segundo analizador de masas para mejorar la resolución (*i.e.* la capacidad para distinguir iones de m/z cercana). Estos equipos contienen un parámetro específico para mejorar la sensibilidad denominado

RPQ. En este trabajo, como se verá más adelante, esta característica del equipo no es imprescindible debido a los analitos estudiados

v) Detección.²⁵ Los iones de las relaciones m/z seleccionadas llegan al detector de forma secuencial. El detector es un multiplicador de electrones de dí nodos discretos que genera y amplifica una señal eléctrica que es proporcional al número de iones que llegan al mismo. El tiempo durante el cual el detector acumula señal antes de presentar un dato para un determinado valor m/z es el tiempo de residencia (aunque en la bibliografía especializada se utiliza de forma generalizada el término en inglés **dwell time**, que será utilizado a lo largo del trabajo) y puede ser ajustado en función de la aplicación deseada. Para determinaciones multielementales convencionales, suele fijarse a 50 ms para maximizar los límites de detección, teniendo en cuenta que un *dwell time* demasiado corto perjudica la eficiencia de la detección y uno demasiado largo prolonga el tiempo de análisis. La acumulación se realiza un número definido de veces, según cuál sea el tiempo de integración. Entre cada *dwell time* tiene lugar un **tiempo de estabilización** (200 μ s en el instrumento de cuadrupolo utilizado), durante el cual el detector deja de acumular señal y el analizador de masas puede cambiar la relación m/z enfocada. El proceso de detección, por lo tanto, se puede comprender como una sucesión de *dwell times* y tiempos de estabilización que tiene lugar durante el tiempo de adquisición que indique el analista, dando lugar a una señal continua que fluctúa con cierta desviación alrededor de un valor medio.

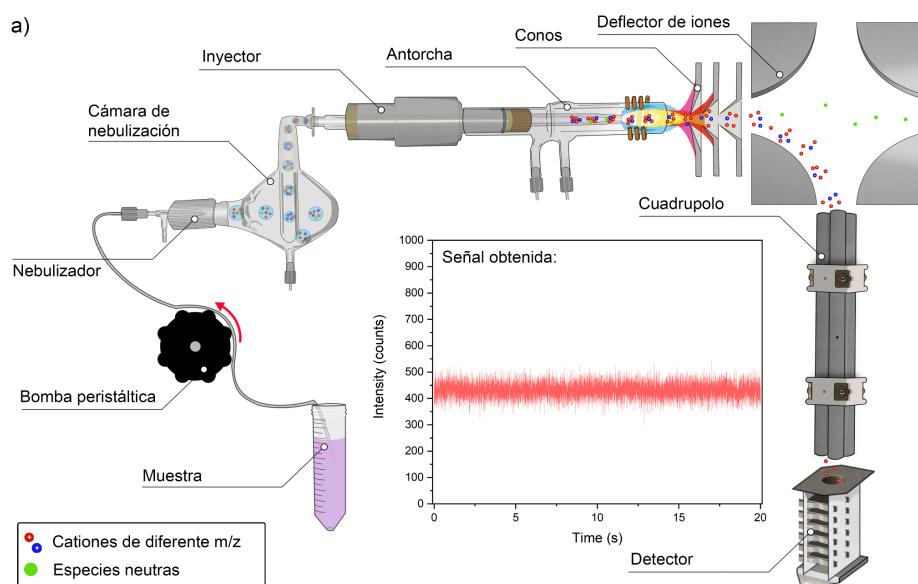


Figura 2. Las etapas convencionales de medida en ICP-MS en su configuración más típica con nebulización neumática. Modificada con permiso de ²⁶.

1.3. ICP-MS para el análisis de eventos individuales

Dentro de la técnica de ICP-MS, existe un modo de trabajo llamado ICP-MS para la detección individual de células (SC-ICP-MS, por sus siglas en inglés *Single Cell Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*). Este modo de trabajo se diferencia del convencional en tres niveles diferentes: la preparación de muestra, el sistema de introducción y el modo de detección.

- i) Preparación de muestra. Como indica el propio nombre de la técnica, el fundamento metodológico de SC-ICP-MS está basado en la detección individual de las células presentes en la suspensión de muestra. Por lo tanto, es indispensable emplear suspensiones de células muy diluidas para que no más de una célula sea ionizada y detectada al mismo tiempo (*i.e.*, dobles eventos), lo que conllevaría la concomitante sobreestimación del contenido de analito por célula. Además, la preparación de muestra tiene que garantizar que las células se conserven íntegras hasta el momento de su introducción, por lo que los disolventes con cierto contenido ácido que son típicamente empleados en el modo convencional (*e.g.*, HNO_3 1% m/m) no son adecuados para esta técnica al poner en riesgo la integridad de la pared celular. En este sentido, el agua desionizada resulta un medio más adecuado, aunque también presenta otros riesgos como la lisis osmótica de las células, por lo que los análisis deben realizarse poco después de la suspensión de las células. Adicionalmente, las células se pueden fijar (típicamente con paraformaldehído o glutaraldehído) para mejorar su resistencia; sin embargo, esto no es necesario para las células concernientes en este trabajo ya que los esporos son suficientemente resistentes de por sí.
- ii) Sistema de introducción. La cámara de nebulización utilizada para medidas convencionales (cámara ciclónica) no suele ser adecuada para la introducción de células, ya que estos sistemas purgan las gotas más grandes mediante la colisión del aerosol contra las paredes, lo que dificulta mantener la célula íntegra hasta su ionización en el plasma. En consecuencia, la cámara de nebulización utilizada en el modo de evento individual tiene un diseño lineal para conseguir que las células (de tamaño variable pero en el entorno micrométrico) lleguen al plasma sin colisiones (véase Figura 3) y se introduce un flujo de Ar adicional (gas de *make up*) que crea un flujo envolvente, asegurando que las células mantengan una trayectoria recta.
- iii) Modo de detección. Las medidas en modo SC-ICP-MS se caracterizan por una adquisición de datos muy rápida que asegure que cada valor de intensidad registrada corresponde a una única célula (evento) o, en su defecto, al disolvente

(señal de fondo). Por lo tanto, siendo que las células dan lugar a eventos de duración entre 300 y 1000 μ s, el *dwell time* de 50 ms empleado en el modo convencional no es óptimo para esta aplicación, ya que la probabilidad de que más de una célula sea medida en la misma ventana de análisis es muy elevada, dando lugar a dobles eventos. En consecuencia, y dependiendo de las características del equipo utilizado, es posible bajar hasta los 10 μ s, aunque las mejores prestaciones se obtienen con 50 - 100 μ s de *dwell time*.³² De esta manera, cada evento generado por una célula individual puede obtenerse como la suma de las señales obtenidas durante 3-10 *dwell times*. Finalmente, en SC-ICP-MS se trabaja con una única relación m/z por análisis, lo que elimina la necesidad de utilizar el tiempo de estabilización que daría lugar a eventos partidos, dificultando el tratamiento de datos.

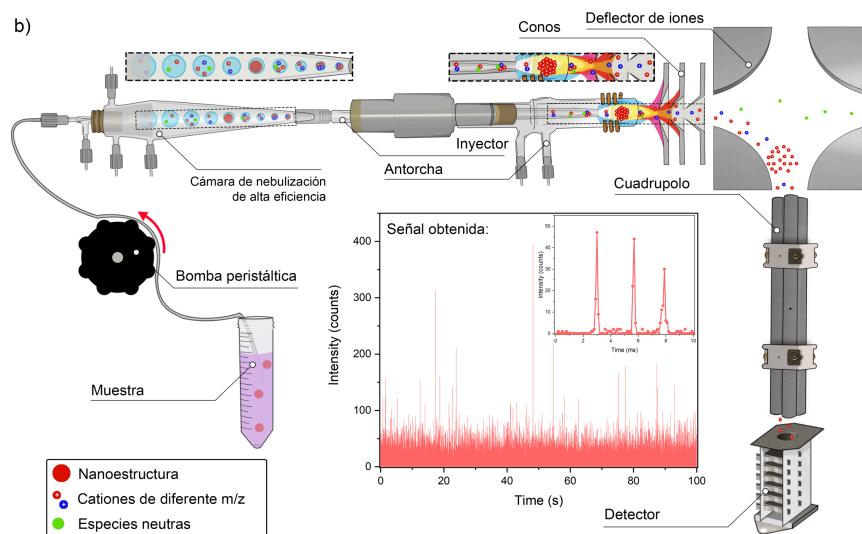


Figura 3. Las etapas principales de medida en ICP-MS para modo de evento individual.

Modificado con permiso de²⁶.

Por lo tanto, la señal registrada en el modo SC-ICP-MS consiste en una serie sucesiva de eventos (picos) de intensidad cuyo área se puede relacionar con la masa de analito en la entidad correspondiente ya que, cuanto mayor sea el contenido en dicho analito, más iones conformarán la nube iónica formada en el plasma y más cuentas registrará el detector. La relación matemática entre intensidad (I, en cuentas) y masa (m, en fg) se muestra en la Ecuación 1.

$$m = \frac{I \cdot t_{dwell} \cdot Q_{muestra} \cdot TE \cdot M}{S_{ion} \cdot 60 \cdot M_{ion}}$$

Ecuación 1. Conversión entre la intensidad y la masa de los eventos individuales generados por una célula en el ICP-MS operado en modo de evento individual.²⁶

El resto de parámetros incluidos en la Ecuación 1 son el *dwell time* (t_{dwell} , en μ s), el caudal de muestra nebulizada ($Q_{muestra}$, en $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$), la sensibilidad (S_{ion} , en $\text{L} \cdot \text{fg}^{-1}$), obtenida como

la pendiente de la curva de calibrado construida con una serie de patrones iónicos del analito y la masa molar del analito (M , en $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) (el 60 del denominador corresponde con la conversión de las unidades del tiempo). La eficiencia de transporte (TE en la Ecuación 1, adimensional) es la proporción del flujo de muestra nebulizada inicialmente que llega al plasma, y es un parámetro muy importante que es necesario determinar para poder calcular la masa de las entidades analizadas.^{27, 28}

En la actualidad se dispone de diversos métodos, tanto directos como indirectos, para el cálculo de esta eficiencia de transporte. En este trabajo se hará uso del método de tamaño de partícula (PSM, por sus siglas en inglés *Particle Size Method*), el cual se basa en la comparación de la sensibilidad obtenida para el elemento estudiado usando una recta de calibrado construida con patrones iónicos y una suspensión de nanopartículas que lo contengan, de las que se conocen tanto el tamaño, como la forma y la composición química, y por tanto la masa de analito presente en las mismas. Se asume que la eficiencia de transporte de las nanopartículas a través del sistema de introducción de muestra es similar al transporte de las células individuales.

La Ecuación 2 recoge el cálculo de la TE realizado a través de este método en el que S_{ion} es la sensibilidad (en $\text{L}\cdot\text{fg}^{-1}$), obtenida como la pendiente de la gráfica de la intensidad frente a la concentración para una serie de patrones iónicos del analito, Q_{muestra} es el caudal de muestra nebulizada (en $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$), t_{dwell} el *dwell time* (en μs), I la intensidad del evento generado por cada nanopartícula (en cuentas) y m la masa total del analito contenido en la nanopartícula analizada (en fg).

$$TE = \frac{S_{\text{ion}} \cdot m}{I \cdot Q_{\text{muestra}} \cdot \frac{t_{\text{dwell}}}{60}}$$

Ecuación 2. Cálculo de la eficiencia de transporte mediante el método del tamaño de partícula.²⁶

Como puede deducirse de lo anterior, las señales analíticas obtenidas en el modo SC-ICP-MS tienen varias diferencias con respecto a las obtenidas en el modo convencional que conviene puntualizar. En primer lugar, la influencia de los parámetros instrumentales de introducción de muestra es diferente. Así, si aumenta el flujo de nebulización, en el modo convencional de medida las señales promedio aumentan de intensidad, mientras que en el modo de evento individual aumenta el número de eventos detectados pero su intensidad no cambia. Una situación similar se obtiene cuando se utiliza una muestra más concentrada con el mismo flujo de nebulización.

Otros aspectos que diferencian las señales analíticas obtenidas en ambos modos, y que deben tenerse en cuenta, son la influencia de posibles interferencias espectrales y la

eficiencia de transporte. Las interferencias espectrales, que son aquellas especies que tienen la misma relación m/z que el analito de interés, provocan en ambos modos que la señal registrada se deba tanto a la muestra como a la interferencia. Sin embargo, mientras que en el modo convencional de medida no se puede hacer una distinción, esto sí ocurre en el modo de evento individual. En concreto, la señal correspondiente a los eventos individuales se aprecia como un pulso intenso sobre un fondo continuo, que corresponde a la señal de la interferencia espectral. Al integrar la señal en la zona continua puede restarse ese fondo de los pulsos detectados. Por otra parte, y en cuanto a la eficiencia de transporte, si esta se reduce en el modo convencional, la intensidad de la señal continua se reduce; mientras que en el modo de evento individual la intensidad de los eventos no cambia, sino que disminuye la frecuencia de eventos detectados, por lo que se reduce el número total de picos detectados en un tiempo dado de análisis. Además, y como se ha indicado en los párrafos anteriores, la determinación de este parámetro resulta fundamental para calibrar la señal analítica en el modo SC-ICP-MS, algo que no es necesario en el modo convencional.

1.4. Antecedentes

ICP - MS es una técnica sobre la que se ha escrito extensamente en muchos campos. Sin embargo, la búsqueda sobre la utilización de esta técnica en la determinación de elementos en bacterias es mucho más reducida.

Nanamiya et al. publicaron en 2004 sobre el análisis de la composición ribosomal de las proteínas de *B. Subtilis* durante su crecimiento, encontrando que el zinc jugaba un papel principal en este proceso.²⁹ Gikunju et al. también publicaron en 2003 un trabajo acerca de *B. Subtilis* y otras bacterias y la utilización de ICP-MS como técnica para su caracterización química, afirmando que elementos como Mg, V, Mn o Zn se encontraban por encima de los límites de detección y que se puede detectar la presencia de diferentes elementos, no solo los utilizados en su estudio, en las bacterias.³⁰

Ha de hacerse hincapié en que en los artículos encontrados se utiliza el modo convencional de medida y no el modo de evento individual. Esto hace destacar la novedad tratada en este trabajo puesto que, hasta la actualidad, no se disponía de la instrumentación adecuada y la aproximación metodológica para poder detectar eventos de tan escasa duración y realizar el análisis elemental de células individuales. De ahí deriva la necesidad de desarrollar un método de análisis que permita caracterizar células individuales para tratar de relacionar sus condiciones de resistencia con su composición elemental, con las consecuencias sociales que esto conlleva comprendida la gran importancia e imperiosidad que tiene esta situación.

2. OBJETIVOS Y ALCANCE DEL TRABAJO

El objetivo principal que se persigue con la realización de este Trabajo de Fin de Grado (TFG) es desarrollar un método de análisis que permita caracterizar la composición elemental de esporas bacterianas individuales mediante SC-ICP-MS. La consecución de este objetivo permitiría realizar el análisis de distintas muestras de esporas bacterianas generadas bajo diferentes condiciones (pH, temperatura, salinidad) para intentar establecer una correlación entre la composición química de las mismas y su resistencia. Esta cuestión, sin embargo, está fuera del alcance de este TFG.

Para conseguir este objetivo principal, se proponen una serie de objetivos secundarios que se detallan a continuación. Se incluye, además, un resumen de la metodología que se empleará en cada caso:

1. Seleccionar los parámetros instrumentales para determinar Mn, Mg, Ca y Zn mediante SC-ICP-MS, elementos para los cuales se ha observado cierta correlación con la resistencia de las esporas en estudios anteriores descritos en la literatura. Esta selección incluye la optimización del flujo de los gases para la mejor sensibilidad y eficiencia de transporte utilizando como modelos dos dispersiones de referencia: una dispersión de nanopartículas de oro por un lado y una dispersión de esporas bacterianas por otro.
2. Validar el método de análisis desarrollado. Para tal fin se procederá a la comparación de los resultados cuantitativos obtenidos para el análisis de dos muestras de esporas bacterianas mediante SC-ICP-MS por un lado y mediante ICP-MS en modo convencional tras la digestión ácida de las muestras, por otro.
3. Elucidar si es necesaria la utilización de un tampon para lavar la superficie de las células durante la preparación de los cultivos de esporas para eliminar pequeñas cantidades de los analitos que puedan estar adheridas a la membrana celular y que podrían alterar los resultados cuantitativos mediante SC-ICP-MS. Para tal fin se realizará el análisis de dos muestras de esporas bacterianas preparadas con y sin tampon y se procederá a la comparación de los resultados obtenidos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos y muestras

Durante la realización de este TFG se ha trabajado con disoluciones patrón de Mn ($\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ en HNO_3 0,5 mol·L $^{-1}$, CertiPUR ®, Merck, Darmstadt, Alemania), Mg ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ en HNO_3 2-3%, CertiPUR ®, Merck, Darmstadt, Alemania), Ca ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ en HNO_3 2-3%, CertiPUR ®, Merck, Darmstadt, Alemania) y Zn ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ en HNO_3 0,5 mol·L $^{-1}$, CertiPUR ®, Merck, Darmstadt, Alemania), de diferentes concentraciones (de entre 1 y 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Estas disoluciones fueron preparadas gravimétricamente, mediante dilución seriada partiendo de disoluciones madre de $10^6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, y utilizando HNO_3 al 2% (v/v) como disolvente. En todos los casos se utilizó agua desionizada (resistividad > 18.2 MΩ cm) obtenida mediante un sistema de purificación Milli-Q (Molsheim, Francia).

Las muestras de esporas han sido proporcionadas por el grupo Nuevas Tecnologías de Procesado de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. Las muestras consisten en una suspensión de esporas *Bacillus Subtilis* preparadas en dos medios diferentes. La primera de las dispersiones fue preparada utilizando una disolución 200 mM de tampon Tris-HCL (Sigma) (pH 8.0) para suspender las esporas, mientras que para la segunda muestra se ha utilizado agua desionizada como agente dispersante. La muestra tratada con el tampon contiene $8,7 \cdot 10^7$ esporas·mL $^{-1}$ y la que no ha sido tratada $9,7 \cdot 10^7$ esporas·mL $^{-1}$, según el conteo realizado con el microscopio óptico. Para la validación del método de análisis mediante SC-ICP-MS, se ha tomado una alícuota de cada una de estas dispersiones y se ha digerido en un bloque digestor utilizando recipientes cerrados de PTFE y una disolución de HNO_3 del 65% (m/m) (Suprapur ®, Merck, Darmstadt, Alemania) y H_2O_2 del 30% (m/m) (VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, France). Para la optimización del flujo de gases se ha utilizado una suspensión de nanopartículas de oro de referencia de 60 nm de diámetro nominal (HiQ-Nano, Arnesano, Italia).

Para las determinaciones mediante el modo convencional se han añadido además dos estándares internos, Ga ($\text{Ga}(\text{NO}_3)_2$ en HNO_3 2-3%, CertiPUR ®, Merck, Darmstadt, Alemania) e In ($\text{In}(\text{NO}_3)_2$ en HNO_3 2-3%, CertiPUR ®, Merck, Darmstadt, Alemania) partiendo de disoluciones de $10^6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, de tal forma que se encuentra 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de estos elementos en todas las disoluciones tanto de muestras como de disoluciones de calibración.

3.2. Instrumentación y aparatos

Las medidas se han realizado con un instrumento ICP-MS NexION 5000 (PerkinElmer, Waltham, MA, EEUU). En la Tabla 1 se recogen los distintos parámetros de medida y la configuración del equipo utilizados para la realización de este trabajo.

Para preparar las disoluciones y suspensiones de medida se ha trabajado con tubos graduados de 10 mL y micropipetas en el rango de 0,1 a 5 mL.

Tabla 1. Parámetros instrumentales para realizar las medidas mediante ICP-MS en los modos de trabajo convencional y de evento individual.

	Modo convencional	Modo de evento individual
Flujo de gas de nebulización (L·min ⁻¹)	1,02	0,3
Flujo de gas de <i>make up</i> (L·min ⁻¹)	-	0,85
Flujo de gas plasmógeno (L·min ⁻¹)		16
Flujo de gas auxiliar (L·min ⁻¹)		1,2
m/z monitorizadas	25 (Mg), 44 (Ca), 55 (Mn), 66 (Zn), 69 (Ga) [*] , 115 (In) [*]	
<i>Dwell time</i>	50 ms	100 µs
Tiempo de estabilización (µs)	200	-

*Únicamente monitorizadas en el modo convencional de medida como estándar interno.

3.3. Procedimiento para realizar las medidas

3.3.1 Preparación de las muestras e introducción al ICP-MS

Como se ha indicado en la sección 3.1 el número de esporas por mililitro de cada muestra es conocido ($9,7 \cdot 10^7$ para la muestra sin lavar y $8,7 \cdot 10^7$ para la muestra lavada con tampon) porque se ha realizado un conteo a través de un microscopio óptico. Para tal fin se han colocado 20 µL de muestra en un portaobjetos y tras colocar el cubreobjetos se ha procedido a observar por el microscopio óptico. El procedimiento se basa en contar manualmente las esporas observadas en 5 cuadrados distintos de la cuadrícula que se obtiene al contemplar la muestra, tal y como se observa en la Figura 4, y se aplica un factor de ponderación para obtener finalmente el número de esporas por mililitro.



Figura 4. Imagen observada desde el microscopio óptico para realizar el conteo de esporas.

En primer lugar, para la medida mediante el modo de evento individual se ha preparado una recta de calibrado multielemental incluyendo los analitos estudiados, como se ha indicado en la sección 3.1. Las muestras de esporas han sido diluidas en agua desionizada hasta obtener una concentración óptima para llevar a cabo su determinación mediante esta técnica (probabilidad de dobles eventos inferior al 1%). Estas disoluciones de calibrado y las muestras se han introducido en el equipo mediante una **bomba de jeringa** que permite un flujo constante de $20 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

Para la medida mediante el modo convencional se ha preparado una recta de calibrado multielemental, como se ha indicado en la sección 3.1, incluyendo, además de los analitos estudiados, dos estándares internos, Ga e In. Estos se han añadido tanto a las muestras como a todos los puntos del calibrado y blancos para que los posibles efectos matriz y las perturbaciones instrumentales afecten de igual forma a los analitos y a los estándares internos, por lo que al utilizar el cociente de las intensidades como señal analítica estos fenómenos se verán corregidos. Las muestras de esporas, así como dos blancos de método (agua desionizada), han seguido el siguiente proceso de digestión: se ha añadido en un recipiente cerrado de PTFE 100 μL de la muestra de esporas o blanco, 2 mL de disolución de HNO_3 65% (m/m) y 1 mL de disolución de H_2O_2 30% (m/m). Se ha dejado durante 24 horas a unos 110 °C tapado y, tras esto, se ha destapado y dejado a unos 80 °C hasta sequedad. Posteriormente, se han añadido 500 μL de HNO_3 2% (v/v), se han pipeteado 100 μL de esta disolución y, tras añadir 10 μL de disolución de $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de estándar interno, se ha llevado a 1 mL final con agua desionizada. Tanto las disoluciones como las muestras han sido introducidas en el equipo mediante un tubo de 0,38 mm de diámetro interno haciendo uso de una **bomba peristáltica**.

En la Tabla 2 se recopila la configuración del equipo utilizado referido a la introducción de las disoluciones y las muestras.

Tabla 2. Recopilatorio de la configuración del equipo ICP-MS NexION 5000 utilizado.

	Modo convencional	Modo de evento individual
Sistema de introducción de muestra	Bomba peristáltica	Bomba de jeringa
Cámara de nebulización	Ciclónica de cuarzo	Asperón de cuarzo
Caudal de muestra ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	0,23	0,02

3.3.2. Análisis y calibración

Para llevar a cabo las medidas en modo de evento individual, el primer paso ha sido determinar la eficiencia de transporte que, como se ha definido en la introducción, evalúa la proporción de células que verdaderamente llegan a ser detectadas frente a las introducidas y es un parámetro que ha de cuantificarse para poder determinar el valor de masa de cada analito en las muestras de esporas. Para ello, se han empleado una dispersión de nanopartículas de oro de tamaño conocido (60 nm de diámetro) y una recta de calibrado de oro en forma iónica construida con disoluciones patrón de entre 0 y $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

La eficiencia de transporte se ha calculado de acuerdo a la Ecuación 2 anteriormente presentada en la sección 1.3, una vez medidos tanto el estándar de nanopartículas como los estándares iónicos. Esta estrategia asume que el transporte es similar para las nanopartículas y las esporas, lo que es una buena aproximación como se verá más adelante. Sabiendo que la sensibilidad para la recta de calibrado iónica (S_{ion}) es $2,1545 \text{ L}\cdot\mu\text{g}^{-1}$, el caudal (Q_{muestra}) es $0,02 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, el *dwell time* (t_{dwell}) son $100 \text{ }\mu\text{s}$, el tamaño de las nanopartículas (m) es 60 nm (el cual se convierte a unidades de masa haciendo uso del volumen ($1,13\cdot10^{-16} \text{ cm}^3$) y la densidad del oro ($19,32 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$)) y la intensidad para cada nanopartícula (I) son 894 cuentas, la eficiencia de transporte resulta 0,1578. Este dato indica que aproximadamente un 16% de las nanopartículas producidas en el sistema son detectadas. Tanto la recta de calibrado realizada como el histograma de intensidad correspondiente se incluyen en el Anexo 1.

A continuación, se ha realizado la medida mediante el modo de evento individual utilizando los parámetros instrumentales indicados en la Tabla 1 de la sección 3.2 obteniendo una señal de intensidad respecto del tiempo para una determinada relación m/z . El tratamiento de esta señal analítica para su posterior procesado se describe en la sección 3.3.3.

Para el análisis mediante el modo convencional se han medido los preparados anteriormente comentados y, una vez obtenidos los resultados, se han representado las curvas de calibración, situando la concentración en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en el eje de abscisas y,

exceptuando el Ca, la intensidad del analito dividida entre la intensidad del estándar interno en el eje de ordenadas. Para este elemento se ha representado su intensidad únicamente porque se suman una sensibilidad baja y un fondo alto, provocando que si la intensidad del Ca se divide entre la intensidad del estándar interno, estas son casi 0 y el ruido predomina. A la vista de que la recta de calibrado tenía una linealidad aceptable y que no se esperaban efectos matriz, se ha utilizado la calibración directa con este analito. La recta de calibrado obtenida para cada analito se incluye en el Anexo 2.

3.3.3. Tratamiento de datos

Para el procesamiento de los datos obtenidos mediante el modo de evento individual se ha utilizado la Ecuación 1 de la sección 1.3, con la que se han transformado los datos de intensidad en masa, y los softwares HDIP (por sus siglas en inglés *Hyper Dimensional Image Processing*, versión 1.8.4) y OriginPro (versión 2021b, 9.85). El primer programa permite introducir el fichero de datos obtenido del equipo (valores de intensidad en cuentas frente al tiempo) y observar los eventos obtenidos tras la medida como picos intensos sobre un continuo compuesto de interferencias o señales iónicas. La señal analítica se obtiene como el área neta de esos eventos intensos restada la contribución del continuo. Permite, además, ajustar distintos parámetros para evitar perder eventos o excluir señales que no lo son para que no se tengan en cuenta. Por otra parte, OriginPro permite realizar diferentes representaciones, como diagramas de contorno o distintos tipos de histogramas, como las que se verán a lo largo de este TFG.

La presentación de los resultados obtenidos mediante el modo de evento individual se ha realizado concretamente con histogramas de masa, en los que se representa la frecuencia con la que se detectan eventos de un rango de masas determinado (en femtogramos). Para hacer esta representación, los valores de las intensidades obtenidos del equipo se han convertido a valores de masa a través de la Ecuación 1 presentada en la sección 1.3. Sabiendo que el *dwell time* (t_{dwell}) son 100 μ s, el caudal de muestra nebulizada ($Q_{muestra}$) son 0,02 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, la eficiencia de transporte (TE) es 0,1578 y utilizando la sensibilidad (S_{ion}) de la recta de calibrado correspondiente a cada analito, se ha sustituido cada valor de intensidad obteniendo el correspondiente valor de masa.

El procedimiento para tratar los datos obtenidos mediante el modo convencional ha consistido en interpolar la intensidad obtenida para las muestras en las diferentes rectas de calibrado (una para cada analito). De esto, se ha obtenido un valor de masa a partir del cual, tras haber aplicado los factores de dilución correspondientes, se ha obtenido el contenido de cada analito por célula promedio.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Optimización de parámetros instrumentales

De acuerdo con el Objetivo secundario 1, es necesario llevar a cabo una optimización previa y una correcta selección de los isótopos de los elementos de interés antes de llevar a cabo los análisis para el modo de medida convencional y para el de evento individual. En este sentido, como se ha mencionado anteriormente, las condiciones deben ser óptimas para el análisis cuantitativo de Mn, Mg, Ca y Zn. Estos elementos se han elegido ya que son liberados y acumulados durante la germinación de las esporas de las bacterias *Bacillus*.¹³

4.1.1. Selección de nucleidos y tiempos de medida

En cuanto a los isótopos medidos en cada caso, para el Mn y para el Zn se ha medido su isótopo mayoritario, 55 y 66, respectivamente, puesto que ni en la matriz ni en las condiciones de trabajo se encuentran interferencias espectrales significativas en estos isótopos. Sin embargo, para el Mg no es posible medir su isótopo mayoritario ²⁴Mg, ya que en la relación m/z 24 se encuentra la interferencia poliatómica ²⁴(CC)⁺, que da lugar a un fondo muy intenso dado no sólo el contenido en C de las muestras orgánicas, sino también la presencia del CO₂ del aire. Por lo tanto, para este analito se ha optado por cuantificar su isótopo ²⁵Mg que, pese a ser menos abundante (abundancia relativa del 0,10)³¹ y, por lo tanto, menos sensible, está mucho menos interferido. De forma similar, el isótopo ⁴⁰Ca tampoco puede ser monitorizado ya que su m/z coincide con la del isótopo mayoritario del Ar, omnipresente en el plasma de acoplamiento inductivo. En consecuencia, el isótopo ⁴⁴Ca resulta más adecuado para este análisis.

De la misma manera, los tiempos de medida también deben seleccionarse adecuadamente para cada modo de medida, ya que, como se ha comentado en la introducción, tienen un gran impacto sobre la precisión y la relación señal-ruido. Por lo tanto, para el modo convencional se ha optado por un *dwell time* de 50 ms, mientras que para el modo de evento individual se han seleccionado 100 μ s. Adicionalmente, recuérdese que en el modo de evento individual no se aplica ningún tiempo de estabilización ya que se monitoriza una única masa, pero en el modo convencional este parámetro está instrumentalmente fijado a 200 μ s (véase Tabla 1).

4.1.2. Optimización del flujo de gases

Como se ha comentado en la sección 1.3, el transporte juega un papel clave en toda medida de SC-ICP-MS ya que es necesario asegurar que las células son eficazmente transportadas al plasma para su correcta ionización, pero este factor no es menos importante para el modo convencional, donde tiene un impacto directo sobre la sensibilidad. Por lo tanto, es necesario optimizar los flujos de gases que transportan la muestra (nebulización y, en el modo de evento individual, también *make up*) para poder maximizar el transporte.

En el modo convencional, el único flujo de gases que se somete a optimización es el gas de nebulización. Para ello, se ha llevado a cabo de forma rutinaria un *daily performance check*, opción del instrumento en la que se nebuliza una disolución de referencia con varios analitos que cubren todo el espectro de masas, modificando ciertas variables instrumentales (entre ellas el gas de nebulización) para maximizar la relación señal-ruido, minimizar la formación de óxidos e iones doblemente cargados (se comprueba que las relaciones $\text{Ce}^{++}(70)/\text{Ce}^+(140)$ y $\text{CeO}^+(156)/\text{Ce}^+(140)$ se mantienen igual o por debajo de 0,03 y 0,025, respectivamente) y comprobar que la respuesta del equipo se encuentra dentro de unos límites adecuados preestablecidos. El flujo de gas óptimo para estas medidas fue identificado a $1,02 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ y, además de este parámetro, se ha ajustado la posición de la antorcha y los voltajes de las lentes iónicas.

Por otro lado, para el modo de evento individual se han monitorizado tanto una suspensión de nanopartículas de oro de 60 nm que se emplearán para el cálculo del TE como una de las muestras de esporas (utilizando Mn como elemento indicador) a diferentes combinaciones de los gases de nebulización y de *make up*. Para cada condición, se han registrado eventos durante un minuto y, posteriormente, se han ajustado sus intensidades integradas a distribuciones Gaussianas, extrayendo su valor de intensidad central. Las diferentes intensidades determinadas están recogidas en el Anexo 3 y se representan en la Figura 5 como un mapa de contorno. En esta figura se puede observar cómo, al aumentar el gas total (*i.e.*, la suma del flujo de gas de nebulización y *make up*), la intensidad de los eventos aumenta hasta alcanzar un valor óptimo (caracterizado por una banda de intensidad máxima alrededor de $1,15 \text{ L min}^{-1}$ de gas total) por encima del cual la sensibilidad vuelve a caer. Estas observaciones indican que, cuando el flujo de gas total no es lo suficientemente elevado, no hay energía suficiente para transportar las entidades hasta el plasma, por lo que son desechadas. Sin embargo, conforme se aumenta el flujo de gas, las entidades de menor tamaño comienzan a llegar progresivamente hasta el interior del instrumento hasta que, una vez alcanzado el valor óptimo, todas las células y

nanopartículas son transportadas eficazmente. Aumentar el gas por encima de este valor sólo reduce el tiempo de residencia de las entidades en el plasma, impidiendo su ionización completa y disminuyendo la sensibilidad en consecuencia.

Adicionalmente, debe destacarse que la similitud observada entre el comportamiento de nanopartículas y células al modificar el gas total ratifica la asunción de que ambos tipos de entidad se transportan de la misma manera y, por lo tanto, se pueden emplear las nanopartículas de oro para estimar la eficiencia de transporte de las células muestra.

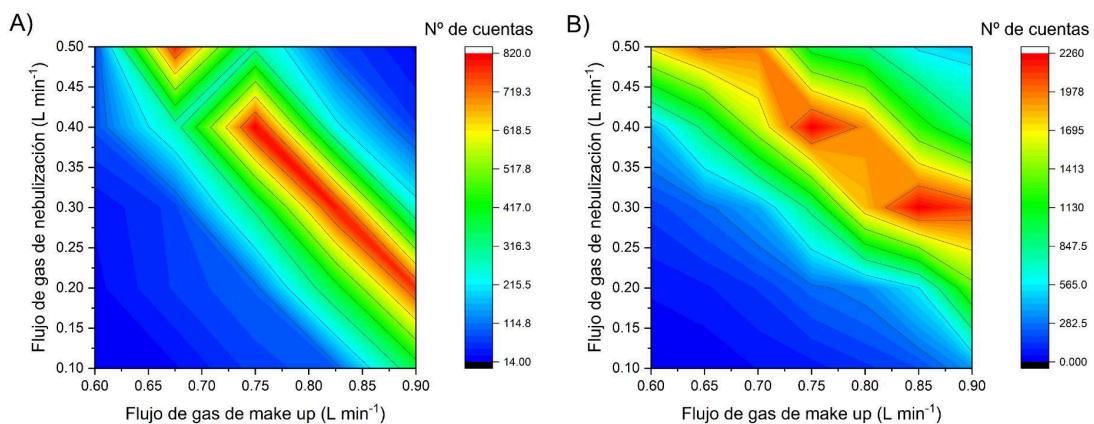


Figura 5. Optimización del gas de *make up* y del gas de nebulización utilizando nanopartículas de oro (A) y esporas (B). Fuente: elaboración propia.

En conclusión, cualquier combinación de gases que dé lugar a un gas total de $1,15 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ será óptima para el desarrollo del método. Sin embargo, los mejores resultados se esperan para flujos de gas de nebulización bajos, ya que las condiciones son más suaves para las células, minimizando riesgos de ruptura. Por lo tanto, en este trabajo se ha seleccionado $0,3 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ de flujo de gas de nebulización y $0,85 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ de flujo de gas de *make up* para llevar a cabo las medidas de SC-ICP-MS, ya que el instrumento está limitado a flujos de *make up* inferiores a $0,9 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, por lo que no se pueden escoger flujos de gas de nebulización inferiores que permitan alcanzar un gas total suficiente.

4.2. Medida mediante el modo de evento individual

De acuerdo con el protocolo de medida y los valores indicados en la sección 3.3.3, las diferentes muestras de esporas fueron analizadas, monitorizando todos los analitos de interés. Para cada uno de ellos, se obtuvo su histograma de intensidad correspondiente, que puede ser convertido a una distribución de masa, de acuerdo a la Ecuación 1 y como se muestra en la Figura 6 para el Mg (para ver las distribuciones del resto de analitos, los lectores son referidos al Anexo 4).

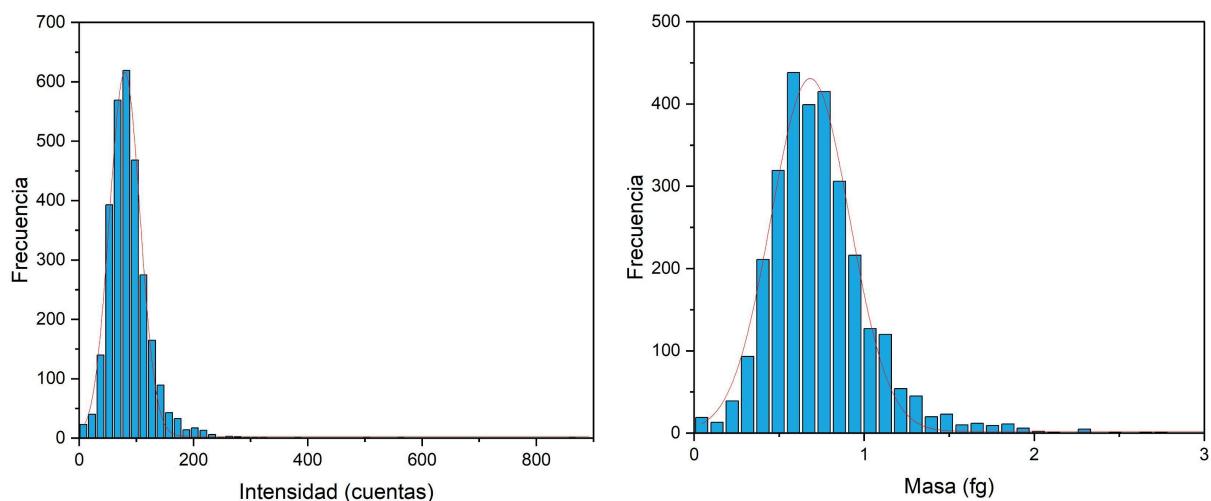


Figura 6. Conversión del histograma de intensidad al histograma de masa para el Mg obtenido del análisis mediante el modo de evento individual de la muestra sin lavar. Fuente: elaboración propia.

Una vez obtenida la distribución en masa de cada analito para cada muestra, se ha llevado a cabo un ajuste Gaussiano, tomando su valor central y un cuarto de su anchura para caracterizar cada una de ellas de forma que se pudieran comparar mediante un test t de Student para evaluar la necesidad del uso del tampon en el lavado de las células previo al análisis mediante SC-ICP-MS. Los resultados están recogidos en la Tabla 3, donde se puede apreciar que no existen diferencias significativas al comparar las distribuciones obtenidas para cualquier analito entre las dos muestras. Por lo tanto, estos resultados parecen indicar que no hay metales adheridos a la membrana celular (o que su influencia es despreciable), por lo que no sería necesario llevar a cabo una limpieza con tampon previa al análisis mediante SC-ICP-MS.

Tabla 3. Valores de masa promedio de cada analito por célula obtenidos mediante el análisis de las muestras de esporas mediante el modo de evento individual y valores de la probabilidad de que la diferencia en el contenido de cada analito sea aleatoria entre las dos muestras de esporas. Las incertidumbres están expresadas como un cuarto de la anchura de la distribución Gaussiana ajustada utilizando OriginPro.

	m Mn (fg)	m Mg (fg)	m Ca (fg)	m Zn (fg)
Muestra sin lavar	$1,43 \pm 0,30$	$0,68 \pm 0,23$	$1,32 \pm 0,25$	$1,72 \pm 1,50$
Muestra lavada con tampon	$1,47 \pm 0,27$	$0,69 \pm 0,27$	$1,28 \pm 0,32$	$1,60 \pm 1,08$
Probabilidad de que la diferencia sea aleatoria (%)	92,11	97,75	92,15	94,82

4.3. Validación mediante el modo convencional

Para validar los resultados alcanzados en la sección anterior (Objetivo secundario 2), se ha llevado a cabo el análisis de las mismas muestras mediante el modo convencional, de acuerdo con el protocolo desarrollado en la sección 3.3.1. En este sentido, tras interpolar las intensidades registradas para cada analito en cada muestra, restando las intensidades obtenidas para los blancos de método, y después de aplicar los factores de dilución correspondientes y dividir por el número de células digeridas, se han obtenido los valores de masa promedio de analito por célula recogidos en la Tabla 4. Nótese que de los dos estándares internos introducidos sólo se presentan los resultados calculados con Ga ya que con ambos se alcanzan conclusiones análogas, pero se espera que la corrección con Ga sea mejor al presentar una relación m/z más similar a la de los analitos de interés.

Tabla 4. Valores de masa promedio de cada analito obtenidos mediante el análisis de las muestras de esporas mediante el modo convencional y valores de la probabilidad de que la diferencia en el contenido de cada analito sea aleatoria entre las dos muestras de esporas. Las incertidumbres están expresadas como desviación estándar (n=5).

	m Mn (fg)	m Mg (fg)	m Ca (fg)	m Zn (fg)
Muestra sin lavar	0,59 ± 0,06	1,01 ± 0,07	3,59 ± 0,45	3,80 ± 0,17
Muestra lavada con tampon	0,65 ± 0,10	0,39 ± 0,10	7,77 ± 0,83	1,37 ± 0,06
Probabilidad de que la diferencia sea aleatoria (%)	56,55	0,18	0,32	0,00

Los resultados mostrados, contradiciendo los observados por SC-ICP-MS, parecen indicar que el lavado con tampon sí que disminuye la presencia de Zn y Mg adheridos a la pared bacteriana, ya que la masa de estos elementos en la muestra lavada es significativamente inferior. En cuanto a los resultados alcanzados para el Mn, las conclusiones parecen estar más alineadas con las obtenidas en la sección anterior, indicando que no es necesaria la utilización del tampon puesto que no existen diferencias significativas entre ambas muestras. Por otro lado, para el Ca se observa que en la muestra lavada la cantidad de este analito es mayor que en la muestra no lavada. Esto podría deberse a que puede haber habido una contaminación del tampon por el ambiente o el modo de preparación del mismo. Esta contaminación habría tenido impacto en el modo convencional y no para SC-ICP-MS porque el Ca estaría en forma iónica, lo que aumenta la intensidad total medida en el modo convencional, sobreestimando la masa, pero no aumenta la intensidad de los eventos ya

que la contribución de la contaminación a la señal de fondo es corregida mediante el protocolo de tratamiento de datos descrito en la sección 3.3.3.

Por lo tanto, estos resultados parecen apuntar a que algunos elementos sí que están adheridos a la membrana celular, pero, al trabajar con muestras tan diluidas en el modo SC-ICP-MS, estos metales son lavados con el propio agente dispersante. Para validar esta hipótesis, así como los resultados obtenidos por el modo de evento individual, se ha llevado a cabo un nuevo test t de Student para comparar los resultados obtenidos con cada modo de operación para las muestras lavadas, que son las únicas para las que se espera que los resultados sean iguales. Los resultados de este test estadístico se resumen en la Tabla 5, donde se puede apreciar que no se han encontrado diferencias significativas entre los resultados alcanzados con cada modo de operación a excepción del Ca, seguramente debido a la contaminación anteriormente mencionada. Por lo tanto, es posible concluir que los resultados obtenidos por el modo de evento individual para células lavadas con tampon son válidos, además de demostrarse la presencia de Mg y Zn adheridos a la membrana. Esto apoya la idea de que la técnica SC-ICP-MS es más adecuada que el modo de trabajo convencional tras digestión para establecer posibles correlaciones entre la composición química de las esporas y su resistencia. Finalmente, cabe mencionarse que si se hace un test t de Student para comparar los resultados de SC-ICP-MS con los alcanzados para el Ca con la muestra sin lavar en modo convencional, los resultados indican que el contenido es significativamente mayor al trabajar con digestiones ($P_0=0,41\%$), lo que significaría que hay Ca en la membrana, pero al llevar a cabo el lavado, se introduce más Ca en forma de contaminación del que se elimina. Por lo tanto, sería necesario repetir la validación para este elemento con una muestra de células lavada con un tampon diferente.

Tabla 5. Valores de la probabilidad de que la diferencia en el contenido de cada analito sea aleatoria entre la muestra lavada del modo convencional y una muestra del modo de evento individual.

	Mn	Mg	Ca	Zn
Probabilidad de que la diferencia sea aleatoria (%)	6,47	26,81	0,03	80,95

5. CONCLUSIONES

Una vez obtenidos todos los resultados se sacan diversas conclusiones respondiendo a los diferentes objetivos que se han planteado al inicio de este trabajo.

En primer lugar, respondiendo al objetivo principal, se ha conseguido desarrollar un método de análisis que ha permitido caracterizar la composición elemental de esporas bacterianas mediante SC-ICP-MS, tal y como se comprueba en este trabajo, a través del desarrollo de los objetivos secundarios planteados. Realizando determinaciones de analitos con una relación encontrada anteriormente (Mn, Mg, Ca y Zn) se han optimizado los tiempos de medida (*dwell time* de 100 μ s), y el flujo de gas total para la introducción de las células (1,15 $L \cdot min^{-1}$ usando un flujo de gas de nebulización de 0,3 $L \cdot min^{-1}$ y un flujo de gas de *make up* de 0,85 $L \cdot min^{-1}$) para obtener una eficiencia de transporte (15,78%) y una sensibilidad adecuadas. En esta última optimización se ha constatado la resistencia de las esporas al establecerse que el transporte de éstas y de las nanopartículas de oro también usadas es semejante, por lo que han podido usarse los datos conocidos de estas últimas para los cálculos posteriores.

Por otro lado, se ha esclarecido que la utilización de un tampon para eliminar metales adheridos a las membranas de las esporas bacterianas es únicamente necesaria para el uso del modo convencional de medida. Se ha conseguido reducir la cantidad de Mg y Zn, que están presentes en la membrana celular, mientras que no ha sido relevante para el Mn y probablemente ha supuesto una contaminación para el Ca (por lo que no se ha podido comprobar si está en la membrana) puesto que su cantidad aumenta en la muestra lavada con tampon. Al utilizar el modo de evento individual no se han encontrado diferencias significativas entre la muestra que ha sido lavada con tampon y la que no tras la realización de las pruebas estadísticas adecuadas. Esto puede deberse a la gran dilución que ha de hacerse a las muestras para la realización de determinaciones a través de esta técnica.

Este método que se ha desarrollado en la elaboración del presente trabajo ha conseguido validarse mediante la utilización del modo convencional de medida para ICP-MS ya que, tras la debida comprobación mediante los test estadísticos convenientes, se ha comprobado que las diferencias en el contenido de cada analito entre la muestra lavada con tampon del modo convencional y la del modo de evento individual no son significativas. Por lo tanto, se concluye que SC-ICP-MS es una técnica analítica que, de cara a futuros estudios, se puede seguir explorando y estudiando en este aspecto y por este camino para seguir dilucidando y, finalmente conseguir saber, qué aspectos de la composición elemental de las esporas son los que las hacen tan resistentes y frenar esta problemática.

REFERENCIAS

- (1) Amálibe-Cuevas, C. F. Global Perspectives of Antibiotic Resistance. In *Antimicrobial Resistance in Developing Countries*; Sosa, A. D. J., Byarugaba, D. K., Amálibe-Cuevas, C. F., Hsueh, P.-R., Kariuki, S., Okeke, I. N., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2010; pp 3–13. https://doi.org/10.1007/978-0-387-89370-9_1.
- (2) Wu-Wu, J. W. F.; Guadamuz-Mayorga, C.; Oviedo-Cerdas, D.; Zamora, W. J. Antibiotic Resistance and Food Safety: Perspectives on New Technologies and Molecules for Microbial Control in the Food Industry. *Antibiotics* **2023**, *12* (3), 550. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030550>.
- (3) Rice, L. B. Antimicrobial Resistance in Gram-Positive Bacteria. *Am. J. Med.* **2006**, *119* (6), S11–S19. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.012>.
- (4) Josephs-Spaulding, J.; Singh, O. V. Medical Device Sterilization and Reprocessing in the Era of Multidrug-Resistant (MDR) Bacteria: Issues and Regulatory Concepts. *Front. Med. Technol.* **2021**, *2*, 587352. <https://doi.org/10.3389/fmedt.2020.587352>.
- (5) Higgins, D.; Dworkin, J. Recent Progress in *Bacillus Subtilis* Sporulation. *FEMS Microbiol. Rev.* **2012**, *36* (1), 131–148. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x>.
- (6) Tokano, M.; Tarumoto, N.; Imai, K.; Sakai, J.; Maeda, T.; Kawamura, T.; Seo, K.; Takahashi, K.; Yamamoto, T.; Maesaki, S. Bacterial Meningitis Caused by *Bacillus Subtilis* Var. *Natto*. *Intern. Med.* **2023**, *62* (13), 1989–1993. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.0768-22>.
- (7) Lampropoulos, P. K.; Gkentzi, D.; Tzifas, S.; Dimitriou, G. Neonatal Sepsis Due to *Bacillus Subtilis*. *Cureus* **2021**. <https://doi.org/10.7759/cureus.17692>.
- (8) Hong, H. A.; Huang, J. -M.; Khaneja, R.; Hiep, L. V.; Urdaci, M. C.; Cutting, S. M. The Safety of *Bacillus Subtilis* and *Bacillus Indicus* as Food Probiotics. *J. Appl. Microbiol.* **2008**, *105* (2), 510–520. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03773.x>.
- (9) Gao, X.; Ma, Q.; Zhao, L.; Lei, Y.; Shan, Y.; Ji, C. Isolation of *Bacillus Subtilis*: Screening for Aflatoxins B1, M1, and G1 Detoxification. *Eur. Food Res. Technol.* **2011**, *232* (6), 957–962. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1463-3>.
- (10) Tasaki, S.; Nakayama, M.; Shoji, W. Morphologies of *Bacillus Subtilis* Communities Responding to Environmental Variation. *Dev. Growth Differ.* **2017**, *59* (5), 369–378. <https://doi.org/10.1111/dgd.12383>.
- (11) Archivo: *Bacillus subtilis.jpg* - Wikipedia, la enciclopedia libre. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bacillus_subtilis.jpg (accessed 2024-06-05).
- (12) Keynan, A. Chapter 1 The Outgrowing Bacterial Endospore as A System for the Study of Cellular Differentiation. In *Current Topics in Developmental Biology*; Elsevier, 1969; Vol. 4, pp 1–36. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)60479-2](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)60479-2).
- (13) Chen, Y; Barat, B; Ray, K; Helm, R; Melville, S; Popham, D. *Membrane Proteomes and Ion Transporters in Bacillus anthracis and Bacillus subtilis Dormant and Germinating Spores*. Journal of Bacteriology. 2019, Volume 201. <https://doi.org/10.1128/jb.00662-18>. (accessed 2024-02-04)
- (14) Desvelados los secretos de las esporas bacterianas. CORDIS | European Commission. <https://cordis.europa.eu/article/id/188360-bacterial-spores-reveal-their-secrets/es> (accessed 2024-05-24).
- (15) Beaman, T; Gerhardt Philipp; *Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization, and thermal adaptation*. *Applied and environmental microbiology*. 1986. <https://doi.org/10.1128/aem.52.6.1242-1246.1986>. (accessed 2024-02-04)
- (16) Thomas, R. Preface. In *Practical guide to ICP -MS: a tutorial guide for beginners*; Third edition; CRC Press; ISBN-13: 978-1-4665-5544-0; 2013; p 5.
- (17) Fu, L.; Shi, S.-Y.; Chen, X.-Q. Accurate Quantification of Toxic Elements in Medicine Food Homologous Plants Using ICP-MS/MS. *Food Chem.* **2018**, *245*, 692–697. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.136>.

- (18) Xu, X.; Wang, H.; Li, H.; Sun, H. Metalloproteomic Approaches for Matching Metals to Proteins: The Power of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS). *Chem. Lett.* **2020**, 49 (6), 697–704. <https://doi.org/10.1246/cl.200155>.
- (19) Gäßler, H.-E. Applications of Magnetic Sector ICP-MS in Geochemistry. *J. Geochem. Explor.* **2002**, 75 (1–3), 1–15. [https://doi.org/10.1016/S0375-6742\(01\)00197-2](https://doi.org/10.1016/S0375-6742(01)00197-2).
- (20) Thomas, R. Chapter 3. Sample Introduction. In *Practical guide to ICP -MS: a tutorial guide for beginners*; Third edition; CRC Press; ISBN-13: 978-1-4665-5544-0; 2013; p 12.
- (21) Thomas, R. Chapter 4. Plasma Source. In *Practical guide to ICP -MS: A tutorial for beginners*; Third edition; CRC Press; ISBN-13: 978-1-4665-5544-0; 2013; p 7.
- (22) Thomas, R. Chapter 5. Interface Region. In *Practical guide to ICP -MS: a tutorial guide for beginners*; Third edition; CRC Press; ISBN-13: 978-1-4665-5544-0; 2013; p 7.
- (23) Thomas, R. Chapter 6 - Ion - Focusing System. In *Practical guide to ICP -MS: a tutorial guide for beginners*; Third edition; CRC Press; ISBN-13: 978-1-4665-5544-0; 2013; p 8.
- (24) Thomas, R. Chapter 7- Mass Analyzers. Quadrupole Technology. In *Practical guide to ICP -MS: a tutorial guide for beginners*; Third edition; CRC Press; ISBN-13: 978-1-4665-5544-0; 2013; p 8.
- (25) Thomas, R. Chapter 11. Ion Detectors. In *Practical guide to ICP -MS: a tutorial guide for beginners*; Third edition; CRC Press; ISBN-13: 978-1-4665-5544-0; 2013; p 9.
- (26) Resano, M.; Aramendia, M.; García-Ruiz, E.; Bazo, A.; Bolea-Fernandez, E.; Vanhaecke, F. Living in a Transient World: ICP-MS Reinvented via Time-Resolved Analysis for Monitoring Single Events. *Chem. Sci.* **2022**, 13 (16), 4436–4473. <https://doi.org/10.1039/D1SC05452J>.
- (27) Pace, H. E.; Rogers, N. J.; Jarolimek, C.; Coleman, V. A.; Higgins, C. P.; Ranville, J. F. Determining Transport Efficiency for the Purpose of Counting and Sizing Nanoparticles via Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2011**, 83 (24), 9361–9369. <https://doi.org/10.1021/ac201952t>.
- (28) Gschwind, S.; Aja Montes, M. de L.; Günther, D. Comparison of Sp-ICP-MS and MDG-ICP-MS for the Determination of Particle Number Concentration. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, 407 (14), 4035–4044. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8620-7>.
- (29) Nanamiya, H.; Akanuma, G.; Natori, Y.; Murayama, R.; Kosono, S.; Kudo, T.; Kobayashi, K.; Ogasawara, N.; Park, S.-M.; Ochi, K.; Kawamura, F. Zinc Is a Key Factor in Controlling Alteration of Two Types of L31 Protein in the *Bacillus Subtilis* Ribosome. *Mol. Microbiol.* **2004**, 52 (1), 273–283. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2003.03972.x>.
- (30) Gikunju, C. Detection and Identification of Bacteria Using Direct Injection Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy. *Talanta* **2004**, 62 (4), 741–744. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2003.09.012>.
- (31) Meija, J.; Coplen, T. B.; Berglund, M.; Brand, W. A.; Bièvre, P. D.; Gröning, M.; Holden, N. E.; Irrgeher, J.; Loss, R. D.; Walczyk, T.; Prohaska, T. Isotopic Compositions of the Elements 2013 (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2016**, 88 (3), 293–306. <https://doi.org/10.1515/pac-2015-0503>.
- (32) Thomas, R. Chapter 22. How to select and ICP mass spectrometer. In *Practical guide to ICP -MS: a tutorial guide for beginners*; Third edition; CRC Press; ISBN-13: 978-1-4665-5544-0; 2013; p 36.

ANEXOS

A1. Para llevar a cabo las medidas en modo de evento individual, lo primero que se ha realizado ha sido un calibrado de oro y la medida de nanopartículas de tamaño conocido para poder calcular la eficiencia de transporte. Se adjunta en este anexo la recta de calibrado (junto con su sensibilidad) que ha resultado de este proceso. Además, se incluye el histograma de intensidad resultante tras la determinación mediante el modo de evento individual.

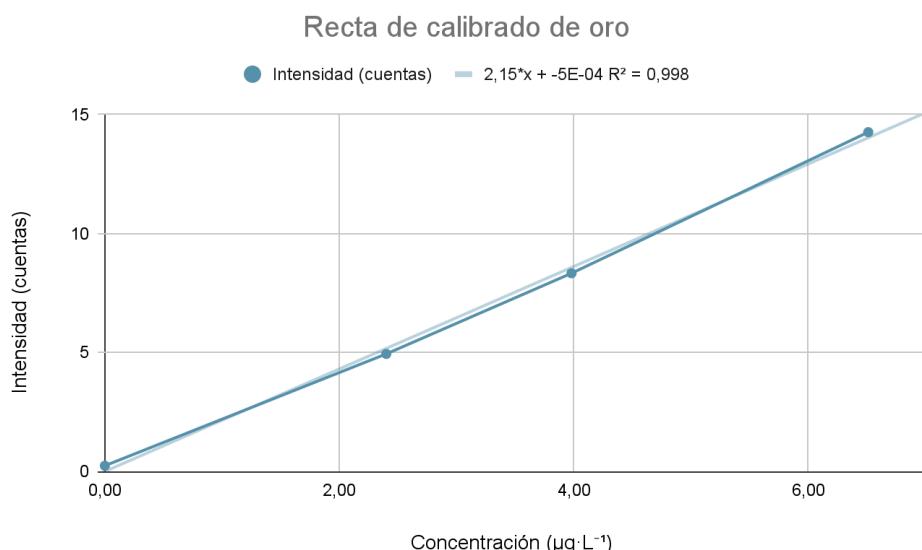


Figura A1. Recta de calibrado utilizando oro en el rango de concentración de 0 a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

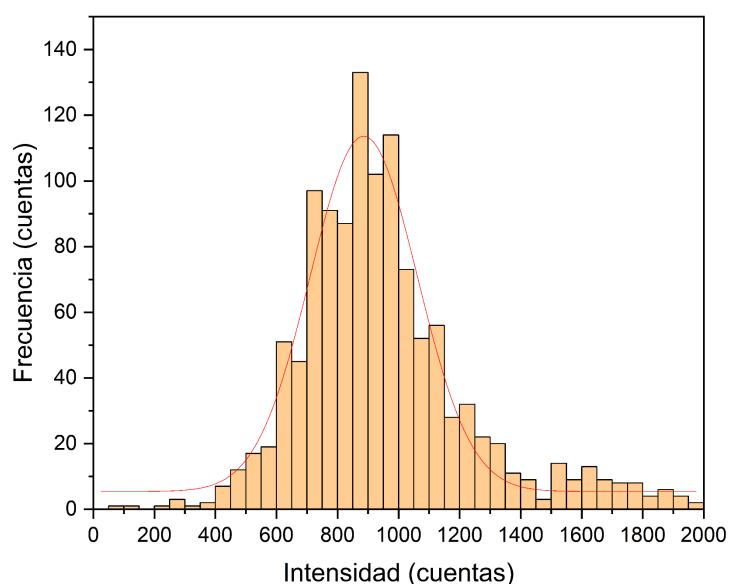


Figura A2. Histograma de intensidad obtenido de la medida de nanopartículas de oro mediante el modo de evento individual para la determinación de la eficiencia de transporte.

A2. Para tratar los datos resultantes mediante el modo convencional y obtener un valor de masa se ha interpolado la intensidad obtenida para las muestras en las diferentes rectas de calibrado (una para cada analito). Se incluyen dichas rectas mediante las Figuras A3-A6.

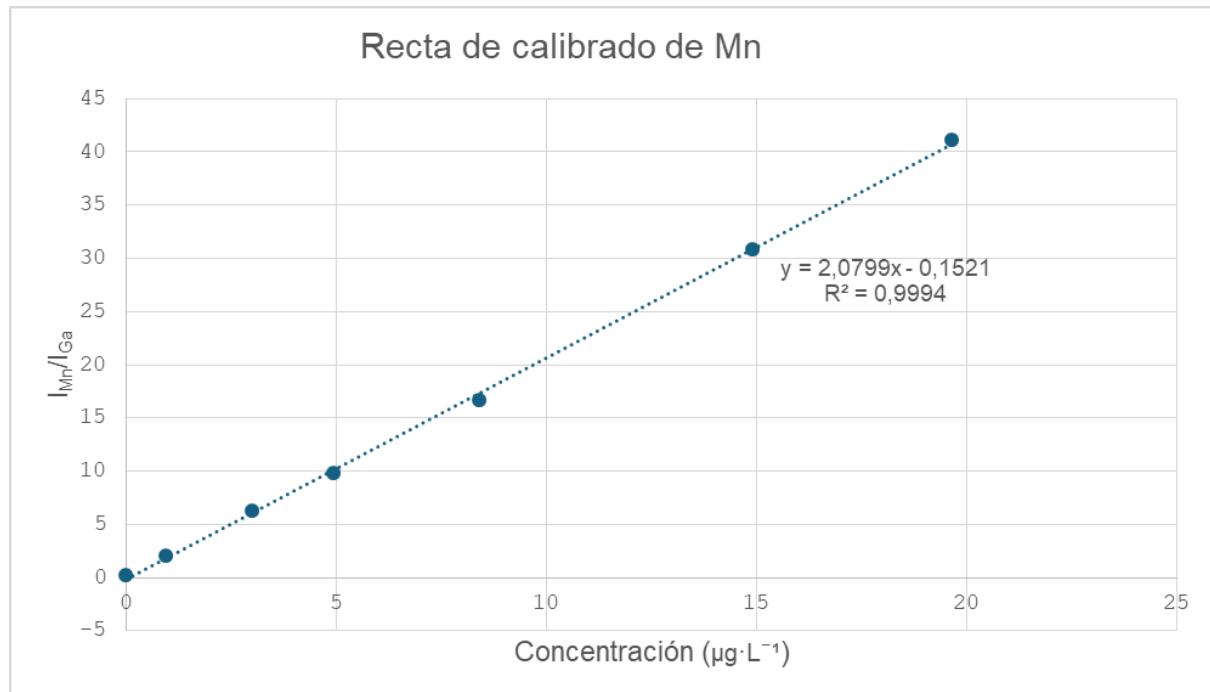


Figura A3. Recta de calibrado de Mn obtenida del análisis mediante el modo convencional.

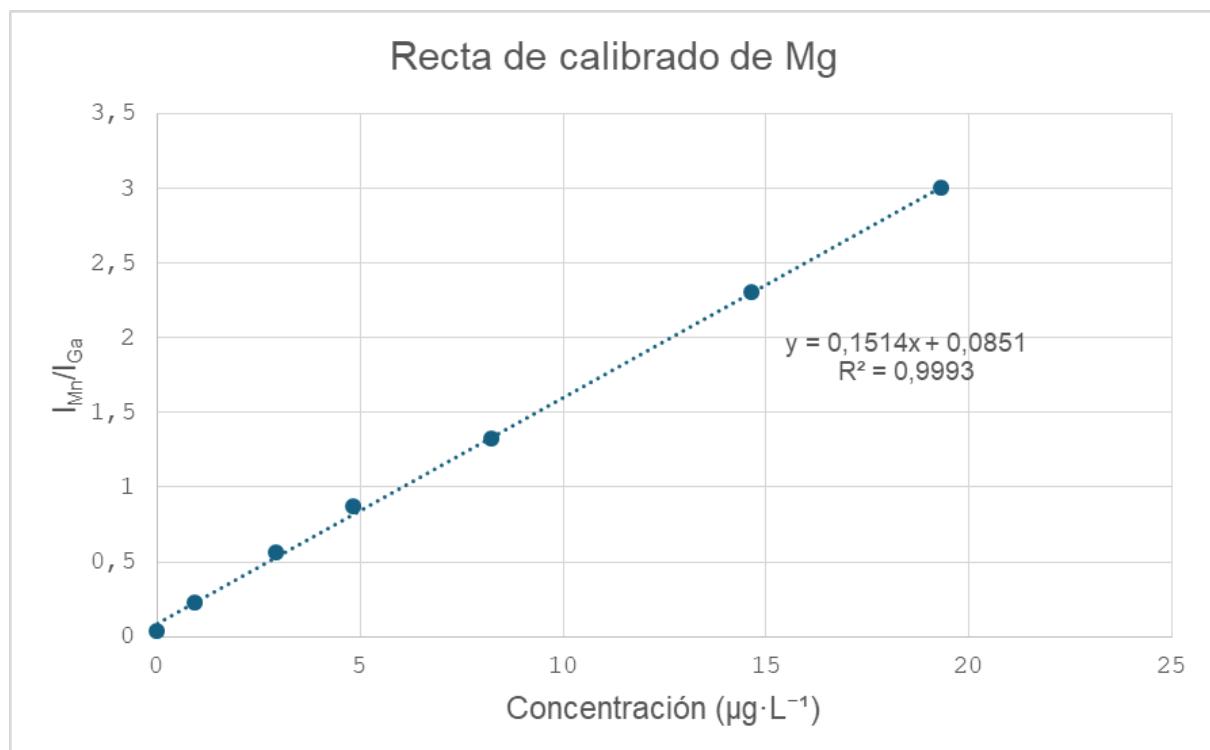


Figura A4. Recta de calibrado de Mg obtenida del análisis mediante el modo convencional.

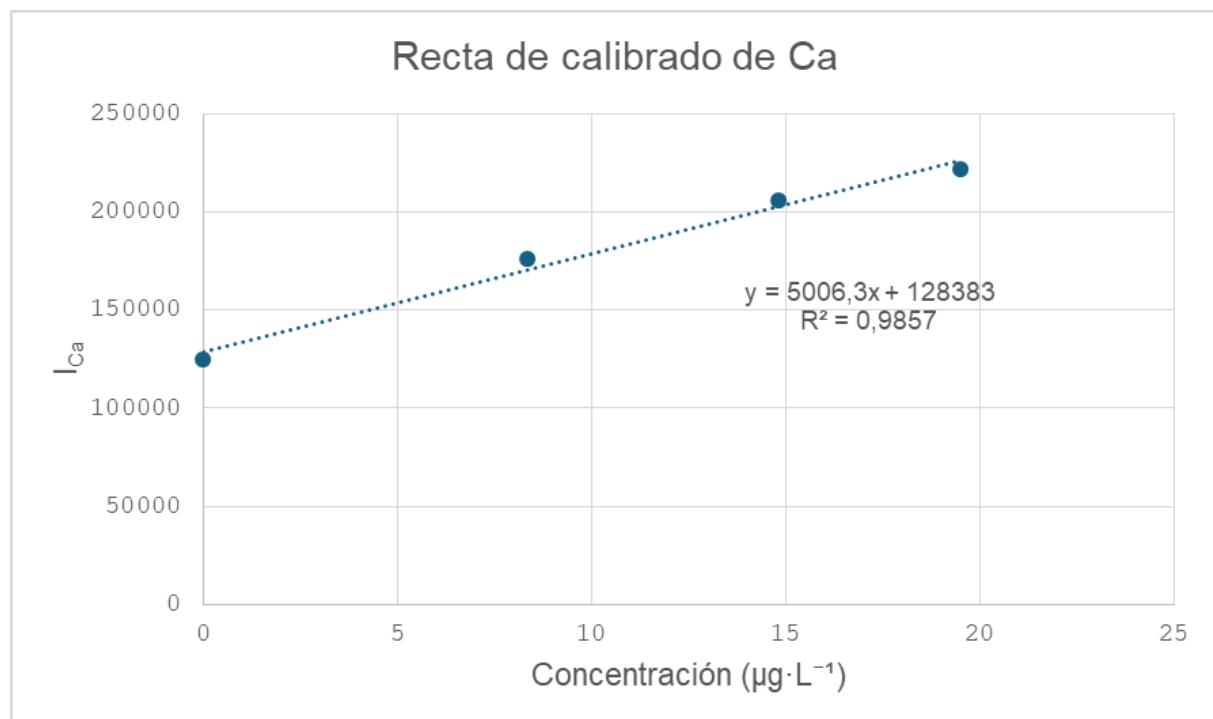


Figura A5. Recta de calibrado de Ca obtenida del análisis mediante el modo convencional.

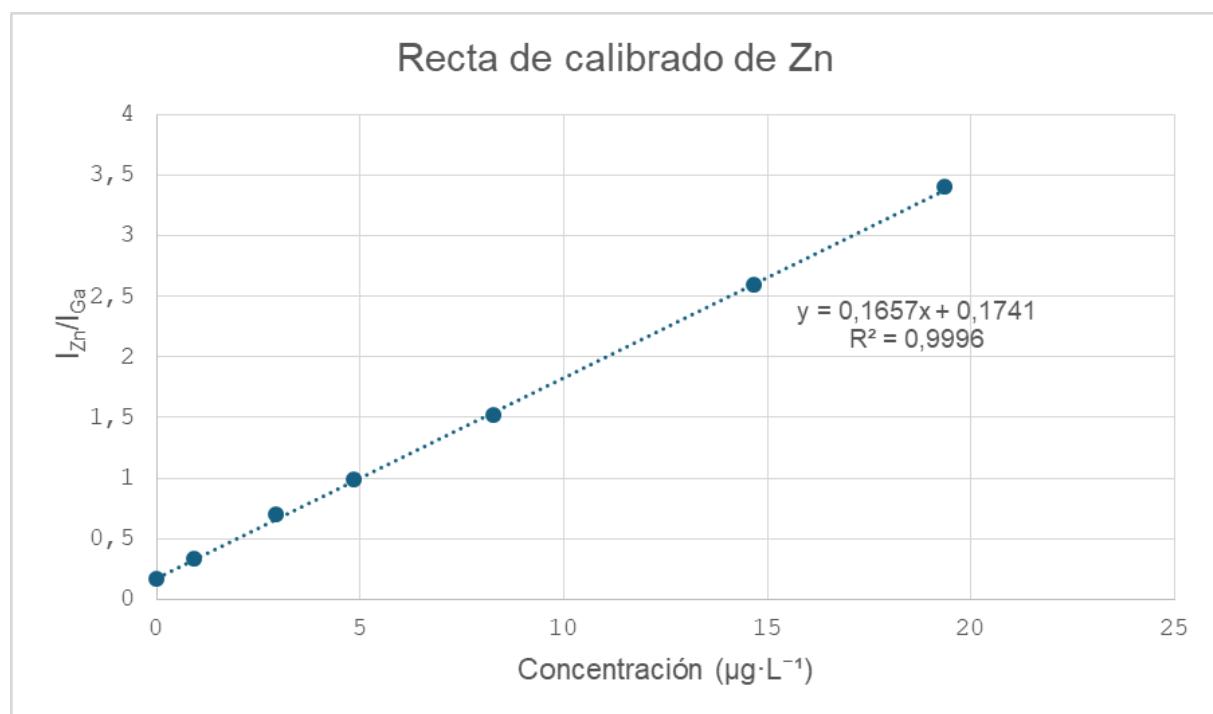


Figura A6. Recta de calibrado de Zn obtenida del análisis mediante el modo convencional.

A3. Se presentan los valores exactos para los flujos del gas de nebulización ($L \cdot min^{-1}$) y de *make up* ($L \cdot min^{-1}$) en las optimizaciones mediante la dispersión de nanopartículas de oro y esporas con los cuales se han creado los diagramas de contorno que pueden verse en la sección 4.1.2.

Tabla A1. Valores obtenidos de intensidad (en cuentas) para las diferentes condiciones de gas de nebulización y de *make up* midiendo nanopartículas de oro.

		Flujo del gas de <i>make up</i> ($L \cdot min^{-1}$)				
		0,6	0,7	0,8	0,85	0,9
Flujo del gas de nebulización ($L \cdot min^{-1}$)	0,1	14,24	28,49	71,22	94,72	372,50
	0,2	25,07	66,95	100,13	387,15	779,71
	0,3	33,76	71,22	333,74	801,79	237,73
	0,4	85,46	277,33	819,74	229,19	66,52
	0,5	67,52	793,67	289,01	79,48	26,55

Tabla A2. Valores obtenidos de intensidad (en cuentas) para las diferentes condiciones de gas de nebulización y de *make up* midiendo manganeso en esporas.

		Flujo del gas de <i>make up</i> ($L \cdot min^{-1}$)						
		0,6	0,65	0,7	0,75	0,8	0,85	0,9
Flujo del gas de nebulización ($L \cdot min^{-1}$)	0,1	5,72	6,54	48,69	73,72	127,5	188,59	359,59
	0,2	53,4	84,92	144,98	256,15	323,59	556,59	1342,02
	0,3	160	254	404	903	1808	2254	2098,27
	0,4	429,22	896,39	1543,69	2254	1929,9	1239,72	852,08
	0,5	1742,01	2021,65	1962,8	1032,23	874,6	532,48	478,78

A4. Como se observa en las Figuras A7-A10, en los histogramas de masa se representa la frecuencia frente a la masa en femtogramos. Puede verse la forma de las distintas distribuciones Gaussianas, de las cuales se ha obtenido para cada analito en cada muestra la masa central.

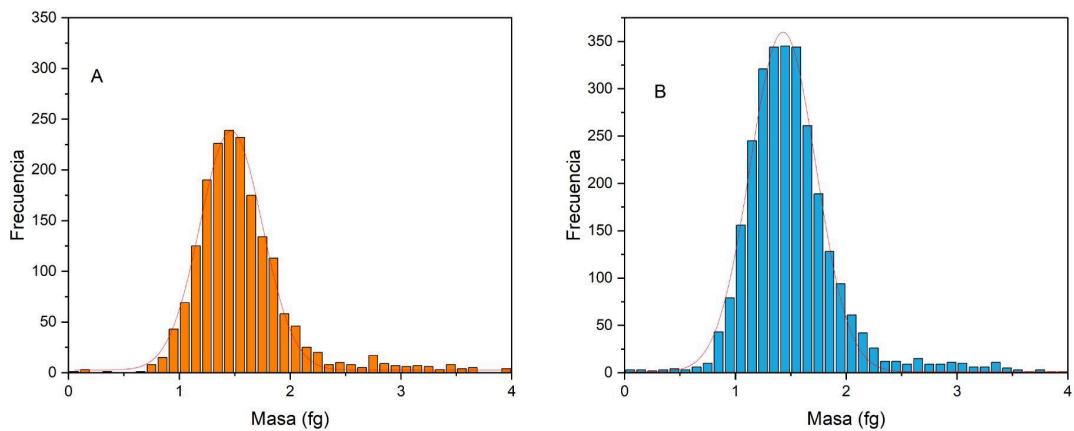


Figura A7. Histograma de masa para el Mn obtenido del análisis de la muestra lavada con el tampon (A) y de la muestra sin lavar (B). Fuente: elaboración propia.

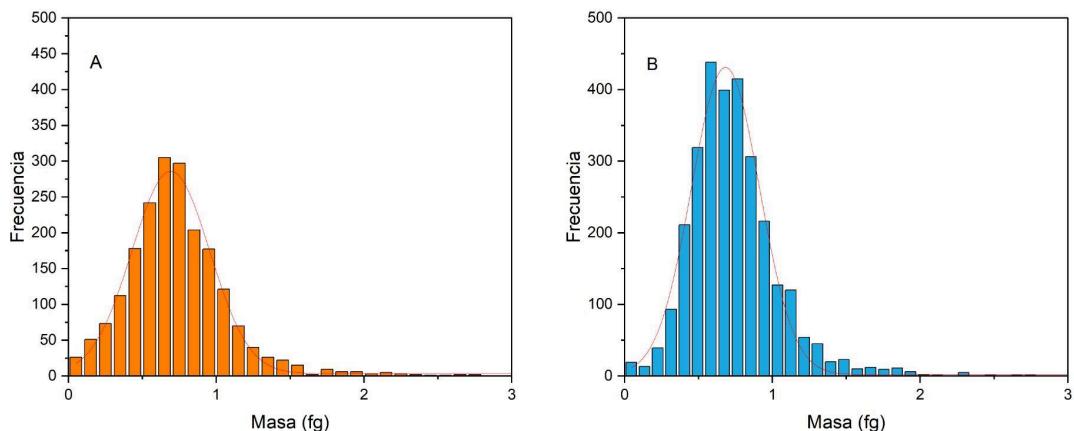


Figura A8. Histograma de masa para el Mg obtenido del análisis de la muestra lavada con el tampon (A) y de la muestra sin lavar (B). Fuente: elaboración propia.

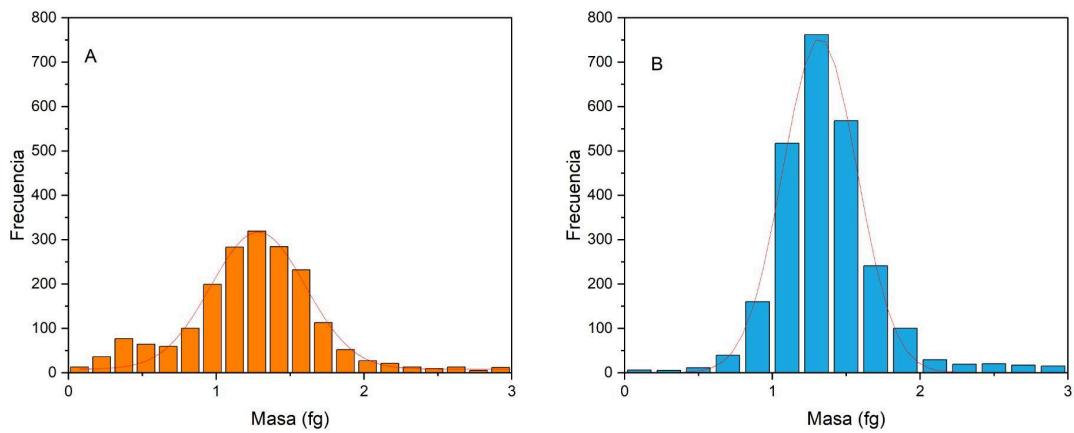


Figura A9. Histograma de masa para el Ca obtenido del análisis de la muestra lavada con el tampon (A) y de la muestra sin lavar (B). Fuente: elaboración propia.

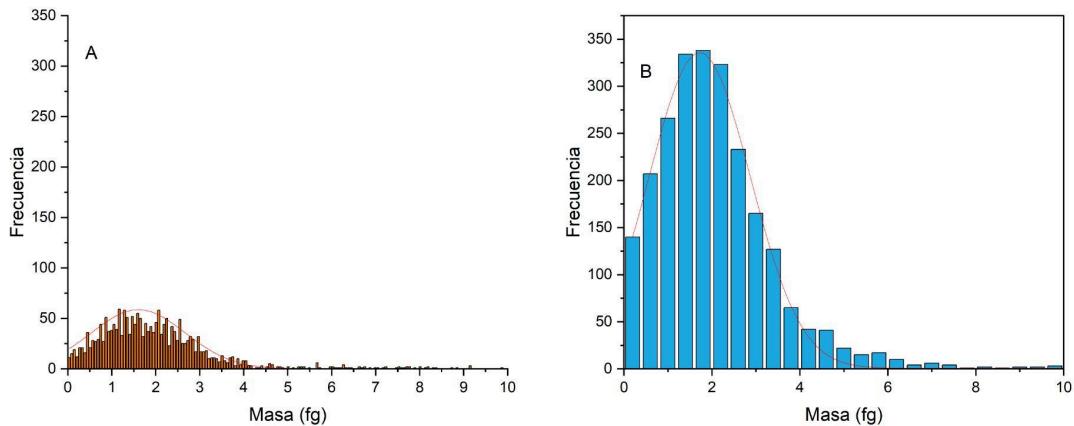


Figura A10. Histograma de masa para el Zn obtenido del análisis de la muestra lavada con el tampon (A) y de la muestra sin lavar (B). Fuente: elaboración propia.