



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Influencia de los procesos de deshidratación en la
resistencia de los esporos de *Bacillus* spp.

Influence of dehydration processes on the resistance of
Bacillus spp. spores

Autor

Juan Vicente Oliete

Directores

Elisa Gayán Ordás y Santiago Condón Usón

Facultad de Veterinaria

2024

ÍNDICE

RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	2
1.1 Importancia de las bacterias esporuladas en los alimentos deshidratados y solubles.....	2
1.2 Estructura del esporo	3
1.3 Resistencia al calor de los esporos	5
1.3.1 Cinética de inactivación por calor	5
1.3.2 Mecanismo de inactivación de los esporos por calor.....	6
1.3.3 Factores que determinan la resistencia al calor de los esporos.....	8
1.3.3.1 Variabilidad intrínseca	8
1.3.3.2 Condiciones ambientales de esporulación	8
1.3.3.3 Propiedades del medio de tratamiento.....	9
1.4 Deshidratación	10
1.4.1 Métodos de deshidratación industriales.....	10
1.4.2 Efecto de la deshidratación en la termorresistencia de los esporos.....	12
2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	13
3 MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 Microorganismo y condiciones de cultivo	15
3.2 Métodos de deshidratación físicos.....	16
3.3 Método de deshidratación químico	17
3.4 Tratamientos térmicos	17
3.5 Recuperación y recuento de supervivencia	18
3.6 Modelización de los datos de los datos.....	18
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1 Resistencia al calor de los esporos sometidos a deshidratación osmótica con glicerol.....	19
4.1.1 Influencia de la actividad de agua y la temperatura	19
4.1.2 Cinética de inactivación por calor de los esporos deshidratados.....	24
4.2 Resistencia al calor de los esporos deshidratados por métodos físicos.....	27
5 CONCLUSIONES.....	29
6 VALORACIÓN PERSONAL.....	31
7 REFERENCIAS	32

RESUMEN

En los últimos años se ha observado en materias primas deshidratadas en polvo, especialmente de origen vegetal, la presencia de esporos bacterianos anormalmente resistentes al calor. Esto supone un grave problema para la industria alimentaria debido a la tendencia actual al desarrollo de nuevos productos vegetales. Todavía se desconocen las causas del aumento de termorresistencia de estos esporos en comparación con los producidos en el laboratorio. Nuestra hipótesis de trabajo es que los procesos de deshidratación contribuyen a reducir el agua del núcleo de los esporos, aumentando su termorresistencia.

En este trabajo se han estudiado los cambios de termorresistencia en los esporos de *Bacillus subtilis* al someterse a distintos procesos de deshidratación (osmótica por adición de glicerol, a vacío y secado por aspersión), y su variación con el tiempo de almacenamiento.

Los resultados obtenidos muestran que la deshidratación puede incrementar la termorresistencia de los esporos de forma distinta dependiendo del método. La deshidratación física (a vacío o por aspersión) incrementó su termorresistencia a 100,0 °C inmediatamente después de aplicar el proceso, y disminuyó tras dos meses de almacenamiento a temperatura ambiente. Sin embargo, la deshidratación osmótica a una actividad de agua (a_w) entre 0,80 y 0,30 y temperaturas de incubación entre 16 y 40 °C, incrementó progresivamente la resistencia de los esporos a 100,0 °C, estabilizándose a los 13 días de almacenamiento. Además, los esporos deshidratados por métodos físicos sólo mostraron mayor resistencia a 100,0 °C, mientras los deshidratados osmóticamente también presentaban mayor resistencia a temperaturas superiores (100,0 °C – 105,0 °C). El aumento de termorresistencia a 100,0 °C en los esporos deshidratados por métodos químicos o físicos observado en este trabajo (entre 1,2 y 1,4 veces), no explica la elevada resistencia de los esporos de la misma cepa que contaminan los productos deshidratados (entre 5 y 10 veces superior).

ABSTRACT

Recently, the presence of abnormally heat-resistant bacterial spores has been observed in dehydrated powder raw materials, especially of plant origin. This represents a serious problem for the food industry due to the current trend to develop new plant products. The causes of the increase in the thermoresistance of these spores compared to those produced in the laboratory are still unknown. Our working hypothesis is that dehydration processes contribute to reducing the water in the core of the spores, increasing their thermoresistance.

In this work, the changes in thermoresistance in the spores of *Bacillus subtilis* have been studied when subjected to different dehydration processes (osmotic by addition of glycerol, vacuum and spray drying), and its variation with the storage time.

The results obtained show that dehydration can increase the thermoresistance of spores in a different way depending on the method. Physical dehydration (vacuum or spray) increased its thermoresistance to 100,0 °C immediately after applying the process, and decreased after two months storage at room temperature. However, osmotic dehydration at a_w between 0,80 and 0,30 and incubation temperatures between 16 and 40 °C progressively increased the resistance of the spores at 100,0 °C, stabilizing after 13 days of storage. Furthermore, spores dehydrated by physical methods only showed greater resistance at 100 °C, while those dehydrated osmotically also showed greater resistance at higher temperatures (100,0 °C – 105,0 °C). The increase in thermoresistance at 100,0 °C in spores dehydrated by chemical or physical methods observed in this work (between 1,2 and 1,4 times) does not explain the high resistance of spores of the same strain that contaminate the dehydrated products (between 5 and 10 times higher).

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de las bacterias esporuladas en los alimentos deshidratados y solubles

Las bacterias que son capaces de formar esporos tienen un papel de gran importancia en el deterioro de algunos alimentos, así como en la transmisión de enfermedades a partir de los alimentos. Los esporos son estructuras latentes, metabólicamente inactivas, que son muy resistentes a condiciones ambientales extremas como son el calor, la deshidratación, la salinidad, la acidez, la radiación, la baja disponibilidad de nutrientes o el agotamiento de oxígeno. Su elevada resistencia favorece la ubicuidad de los esporos en el medio ambiente, haciendo inevitable que puedan entrar en la cadena alimentaria. Si las condiciones de almacenamiento son adecuadas, los esporos pueden germinar en los alimentos y comenzar de nuevo su actividad metabólica (Wells-Bennik et al., 2016).

El principal método que se aplica en la industria alimentaria para inactivar los esporos bacterianos es el tratamiento térmico a elevada intensidad, generalmente a temperaturas superiores a 100 °C. Algunas bacterias son capaces de producir esporos muy resistentes al calor, que sobreviven a los tratamientos de esterilización convencionales produciendo la alteración de los productos almacenados a temperatura ambiente. Esto ocurre más frecuentemente en aquellos productos que contienen ingredientes deshidratados o han sido reconstituidos a partir de materias primas en polvo, los cuales tienden a estar contaminados con una alta concentración de esporos resistentes al calor (Sadiq, Flint y He, 2018). La principal fuente de contaminación de esporos de los productos deshidratados es la materia prima y las propias instalaciones de producción. Las bacterias esporuladas pueden formar biofilms en las superficies de los equipos en contacto con los alimentos, en cuyo interior se forman esporos que se liberan

al alimento (Sadiq et al., 2017). Por ejemplo, la principal fuente de contaminación de esporos de la leche en polvo son los evaporadores y las secciones de regeneración de los intercambiadores de calor, ya que estas instalaciones se encuentran a la temperatura ideal para el crecimiento y esporulación de especies termófilas (45 °C y 75 °C), que producen esporos altamente resistentes al calor (Scott et al., 2007). De hecho, en muchas ocasiones, la concentración de esporos del producto final es mucho mayor que la de la materia prima. Esto supone un gran problema para el sector productor de leche en polvo, ya que existen límites estrictos sobre la concentración de esporos admisibles para la exportación.

Debido al efecto negativo que tienen los tratamientos térmicos sobre la calidad de los alimentos, junto con la alta variabilidad en la resistencia al calor entre las bacterias esporuladas que contaminan un alimento, y el efecto que ejercen las propiedades físico-químicas de cada producto en la termorresistencia de las mismas, es necesario optimizar minuciosamente el tratamiento térmico a aplicar en cada caso (Fine y Gervais, 2005). Aun así, es frecuente que la cantidad de esporos que sobreviven a un tratamiento térmico optimizado alcancen niveles inaceptables, o que provoquen el deterioro de los alimentos con mayor frecuencia a la esperada, incluso tras haber verificado la efectividad del tratamiento con pruebas de esterilidad (Scheldeman et al., 2006). Como consecuencia, la empresa tiene que retirar de la venta lotes enteros de producción, causando grandes pérdidas económicas. Esto es debido a que en muchas ocasiones los esporos aislados en alimentos en polvo tienen una resistencia al calor mayor con respecto a los mismos esporulados en el laboratorio debido a razones todavía desconocidas. Es necesario conocer las causas de estos cambios de termorresistencia para buscar nuevos métodos de inactivación respetuosos con la calidad de los alimentos.

1.2 Estructura del espora

La elevada resistencia de los esporos a estreses ambientales se debe a su peculiar estructura, muy distinta a la de las células vegetativas. Como podemos ver en la Figura 1, el espora está formado por el núcleo, también llamado protoplasto, cubierto por 6 capas, que de dentro a fuera son: la membrana interna, la pared del germen, la corteza o córtex, la membrana externa, la cubierta y el exosporio (Setlow, 2006).

El **núcleo** contiene ADN y ARN. El ADN se encuentra saturado con las proteínas ácido solubles del espora (“small, acid-soluble spore proteins” – SASP), que le aportan protección frente a agentes físicos y químicos. El núcleo del espora se caracteriza por su bajo contenido en agua en comparación con el citoplasma de las células vegetativas, siendo un 25 % del peso húmedo respecto al 80 % en las células germinadas. Este bajo contenido en agua se debe a la presencia de grandes cantidades de ácido dipicolínico (DPA) quelado con iones metálicos divalentes, que

se encargan de desplazar a las moléculas de agua. De hecho, el DPA del espora supone el 25 % del peso del núcleo seco. Además, el bajo estado de hidratación del núcleo se mantiene gracias a la presión ejercida por las capas que lo rodean, principalmente la membrana interna, el córtex y la cubierta. Se propuso que, debido al bajo contenido en agua, el núcleo se encontraba en un estado de gel (Sapru y Labuza, 1993). Sin embargo, estudios recientes con técnicas de resonancia magnética nuclear han demostrado que las moléculas de agua están libres y móviles, y que las macromoléculas están totalmente hidratadas pero inmovilizadas rotacionalmente, probablemente debido a la compresión en que se encuentran los componentes del núcleo. De esta forma, los componentes esenciales se encuentran inactivos, favoreciendo el estado de latencia y protegiéndolos frente a estreses (Colas de la Noue et al., 2020).

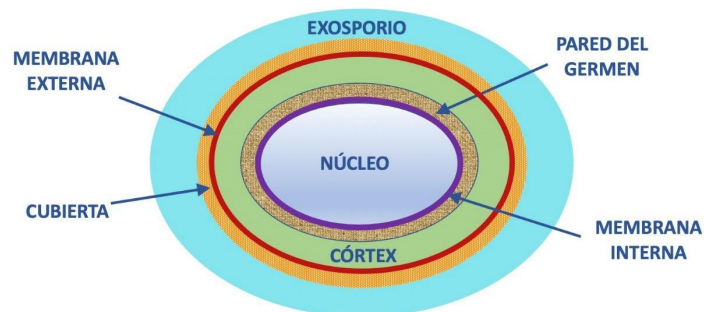


Figura 1. Estructura básica de un espora del género *Bacillus*. Adaptado de Setlow (2006).

La **membrana interna** que rodea al núcleo tiene igual composición a la membrana citoplasmática de las células vegetativas, dando lugar a la misma en la célula germinada. Hasta un 30 % de esta membrana se encuentra altamente comprimida con un alto grado de inmovilización lipídica. Esto hace que tenga una permeabilidad de al menos 2 órdenes de magnitud inferior a las membranas modelo, impidiendo el paso de agentes químicos dañinos (Sunde et al., 2009). Además, también contiene otras proteínas esenciales para desencadenar la germinación, como se verá más adelante. Rodeando a la membrana interna se encuentra la **pared del germen**, que además de formar la pared de peptidoglicano de la célula germinada, no tiene otra función conocida.

La **corteza** está formada por un peptidoglicano similar al de la célula vegetativa, con alguna modificación. Esta parte del espora es esencial para reducir y mantener el contenido de agua del núcleo de los esporos y proporcionarle resistencia mecánica y al calor (Setlow, 2006). La **cubierta** es de naturaleza proteica y está dividida en varias subcapas. Su función es impedir el acceso de moléculas de pequeño tamaño (> 2 a 8 kDA) (Knudsen et al., 2016). Esta capa sirve como primera línea de defensa contra los productos químicos, así como contra las enzimas que degradan el peptidoglicano de la corteza, como la lisozima. Además de proporcionar resistencia

al espora, también desempeña un papel en el comienzo de la germinación, ya que los poros permiten que las moléculas de bajo peso molecular que inducen la germinación lleguen a las capas más internas del espora (Koopman et al., 2022).

La **membrana externa** está formada por la membrana citoplasmática de las células madre. Es posible que esta no conserve su integridad original, por lo que no se considera una barrera de permeabilidad, ni que contribuya a la resistencia de los esporos al calor, la radiación y algunas sustancias químicas (Setlow, 2006). Finalmente, la capa más externa es el **exosporio**, que solo se encuentra en los esporos de algunas especies. Su papel es impedir la permeación de moléculas de gran tamaño (mayor de 150 kDa) (Knudsen et al., 2016). Sin embargo, no tiene apenas efecto en la resistencia al calor o la radiación (Setlow, 2006).

1.3 Resistencia al calor de los esporos

1.3.1 Cinética de inactivación por calor

En el año 1921, Bigelow (1921) observó que el tiempo necesario para inactivar una población de esporos a temperatura constante era una función exponencial de la temperatura de tratamiento. Cuando se representó el logaritmo del tiempo de esterilización requerido versus la temperatura de tratamiento, se obtuvo una línea recta. Esta línea recibió el nombre de tiempo de muerte térmica o “thermal death time” (TDT). Esty y Meyer (1922) observaron que el número de supervivientes de una población tratada a temperatura constante era una función exponencial del tiempo de tratamiento, y la representación del logaritmo de la fracción de supervivientes frente al tiempo de tratamiento permitió obtener una línea recta llamada curva de supervivencia. Gracias a esto, se supo que los tiempos de esterilización se podían calcular matemáticamente conociendo dos parámetros que describen la cinética de inactivación térmica: el tiempo de reducción decimal (D_T) y el valor z . El valor D_T se define como el tiempo de tratamiento aplicado a una temperatura constante para inactivar el 90 % de la población microbiana. El valor z expresa la diferencia de temperatura requerida para un cambio decimal en el valor D_T . Los valores z y D_T son diferentes para cada microorganismo y dependen de las características del medio de tratamiento (composición, pH, actividad de agua (a_w), etc.).

En las últimas décadas, se han publicado miles de curvas de supervivencia en las que se han podido observar desviaciones de la linealidad, siendo los hombros las más frecuentes. Los hombros se observan al inicio de los tratamientos térmicos, cuando la tasa de inactivación microbiana se mantiene próxima a 0 antes de comenzar la fase de muerte exponencial. Estos hombros se han atribuido a la acumulación de daño y actuación de los mecanismos de reparación (Cebrián, Condón y Mañas, 2017). Aunque el mecanismo de inactivación de los esporos frente al calor no se conoce completamente (ver apartado 1.3.2), se sabe que el calor

puede dañar varias estructuras y procesos fisiológicos, y que la muerte celular puede ser el resultado de un acúmulo de daños hasta niveles que impidan la recuperación celular total. De hecho, el efecto de los tratamientos térmicos en una célula no da como resultado siempre la muerte o supervivencia de la misma, sino que se pueden dar estadios intermedios de daño subletal, cuya posibilidad de reparación y por tanto de supervivencia está estrechamente ligado a las condiciones de recuperación de la célula. Por otro lado, los hombros también pueden ser causados por la activación de esporos superlatentes, que son aquellos incapaces de germinar en las condiciones óptimas para la mayor parte de la población latente. Por el contrario, las colas se observan cuando la tasa de inactivación decrece hasta prácticamente cero tras la fase de inactivación exponencial, y se atribuye a la presencia de una población insensible al calor o la presencia de agregados. Para describir estas cinéticas se han desarrollado modelos matemáticos que describen la duración del hombro y el nivel de supervivencia de las colas (Ruiz et al., 2021; den Besten, Wells-Bennik y Zwietering, 2018).

1.3.2 Mecanismo de inactivación de los esporos por calor

Antes de describir el impacto del calor en los esporos, es importante discernir entre los efectos del calor húmedo y el calor seco, ya que estos actúan por mecanismos distintos. En este trabajo, nos centraremos solo en el calor húmedo, ya que los tratamientos de esterilización se aplican a productos con un alto contenido en agua. Como se ha mencionado, no está totalmente claro cuál es el mecanismo de inactivación de los esporos por el calor húmedo, pero se sabe que algunas estructuras y propiedades son esenciales para el desarrollo de su resistencia.

Uno de los factores que más contribuye a la elevada resistencia al calor húmedo de los esporos es el bajo contenido de agua del núcleo, que se relaciona con la cantidad de DPA en el protoplasto. Los esporos de mutantes de *B. subtilis* incapaces de sintetizar DPA poseen mayor contenido de agua en el núcleo y son más sensibles al calor. El efecto protector del bajo contenido de agua del protoplasto se ha atribuido a la inmovilización de las proteínas. La estabilidad térmica de la estructura de las proteínas y por tanto de su funcionalidad depende de las interacciones que se producen entre la proteína y el solvente. El bajo contenido de agua del núcleo aumenta la termoestabilidad de las proteínas y evita que se agreguen de forma irreversible. Se ha demostrado que las proteínas solubles del núcleo tienen una estabilidad térmica 40 °C superior al de las mismas proteínas en solución acuosa (Sunde et al., 2009).

Las SASP que rodean al ADN también contribuyen a la resistencia al calor húmedo de los esporos, ya que los mutantes de *B. subtilis* carentes de los dos tipos α y β son más sensibles. El efecto protector de las SASP no está relacionado con la protección del ADN, ya que se ha demostrado que el calor húmedo, a diferencia del calor seco, no daña al material genético. La

presencia de grandes cantidades de iones metálicos divalentes en el núcleo protege a los esporos del calor, aunque depende de la naturaleza del ion. Los esporos con mayores niveles de Ca^{2+} son más resistentes al calor que los esporos con altos niveles de Mn^{2+} o Mg^{2+} (Setlow, 2006).

El calor también puede provocar la rotura de las envueltas de los esporos, pero no está claro si se debe a los efectos directos del calor o a una consecuencia de la muerte del espora. Se ha observado que cuando se aplica un tratamiento térmico intenso, que inactiva al 99 % de la población, una parte de la población muerta libera el DPA al exterior, pero otra parte mantiene su bajo contenido en agua (Coleman et al., 2010). Algunos de estos esporos pueden germinar cuando se enfrentan a nutrientes, indicando que el calor no inactiva a los esporos dañando a las moléculas que intervienen en las fases iniciales de este proceso, pero son incapaces de multiplicarse y formar colonias.

Aunque la rotura de las barreras de permeabilidad no es la principal causa de muerte de los esporos, se ha demostrado que la presencia de algunas capas es necesaria para su termorresistencia. Los esporos mutantes carentes de la cubierta proteica son más sensibles al calor que los que poseen todas sus capas (Moir, 1981). No está claro si la cubierta ejerce un efecto protector per se o si este deriva de su función de mantener una baja permeabilidad al agua, junto con otras capas. Las teorías más recientes apuntan a que la composición y propiedades de la membrana interna tienen un papel esencial en la resistencia al calor (Setlow y Christie, 2023). Se ha demostrado que las cepas de *B. subtilis* más resistentes al calor poseen en su genoma una o varias copias del operón *spoVA*^{2mob}, muchos de ellos formando parte del transposón Tn1546. Eliminando los distintos genes que posee el operón *spoVA*^{2mob}, se ha identificado a la proteína 2DUF como la responsable del aumento de termorresistencia (Korza et al., 2023). A raíz de este descubrimiento se han encontrado otras proteínas comunes en la mayoría de genomas de las especies esporuladas con homología a uno de los dominios de 2DUF, como YetF y YdfS, cuya eliminación reduce la resistencia al calor en *B. subtilis* (Kanaan et al., 2022). Se cree que todas estas proteínas se encuentran en la membrana interna del espora, haciendo que los lípidos sean aún más inmóviles y por tanto que la membrana sea más rígida e impermeable. Sin embargo, la protección al calor de las proteínas 2DUF y sus homólogos no se debe a un descenso de la permeabilidad de los esporos, ya que los esporos con y sin estas proteínas tienen el mismo contenido en agua. Se ha propuesto que la proteína 2DUF y sus homólogos pueden proteger a otras proteínas ancladas a la membrana que son esenciales para la síntesis de ATP del efecto del calor, impidiendo la biosíntesis y la multiplicación celular (Korza et al., 2023).

1.3.3 Factores que determinan la resistencia al calor de los esporos

1.3.3.1 Variabilidad intrínseca

La resistencia al calor de los esporos varía entre las especies y también entre cepas dentro de la misma especie (Wells-Bennik et al., 2019). Los esporos procedentes de especies termófilas tienden a ser más resistentes al calor que los esporos mesófilos, y estos a su vez son más resistentes al calor que los esporos de especies psicrótrofas. Los esporos más termorresistentes que se conocen proceden de *Geobacillus stearothermophilus* y se utilizan como indicador biológico de la eficacia de los tratamientos de esterilización, aunque algunos esporos de *Bacillus*, como *B. sporothermodurans*, pueden sobrevivir a los tratamientos UHT (Scheldeman et al., 2006). Los esporos de *G. stearothermophilus* tienen un $D_{120^{\circ}\text{C}}$ hasta más de 150 veces superior a las cepas psicrótrofas de *B. cereus* (den Besten, Wells-Bennik y Zwietering, 2018). La variabilidad en resistencia entre cepas puede llegar a igualar la variabilidad interespecífica. Por ejemplo, Berendsen et al. (2015) observaron que los esporos de *B. subtilis* se pueden clasificar en dos grupos, uno resistente y otro sensible al calor, cuyos valores $D_{120^{\circ}\text{C}}$ varían hasta 138 veces.

La diferencia en resistencia intrínseca entre esporos de distintas especies y cepas se ha atribuido a divergencias en el contenido en agua y minerales de los esporos, siendo aquellos con menor humedad y mayor cantidad de iones divalentes los más resistentes al calor, pero no siempre se cumple esta tendencia (Beaman y Gerhardt, 1986). Estudios más recientes han demostrado que las variaciones en termorresistencia en algunas especies de *Bacillus* se correlaciona con el número de operones *spoVA*^{2mob} presentes en su genoma. En *B. subtilis*, la presencia de 2 o más copias del operón proporciona a los esporos valores $D_{100^{\circ}\text{C}}$ más de 200 veces mayores que las cepas sin el operón (Berendsen et al., 2016).

1.3.3.2 Condiciones ambientales de esporulación

La resistencia al calor dentro de los esporos de una misma cepa puede verse influenciada por las condiciones ambientales de esporulación como la temperatura de incubación, la composición del medio, pH, a_w y la composición de la atmósfera (Bressuire-Isoard, Broussolle y Carlin, 2018). Es más, se ha observado que la variabilidad en resistencia al calor ejercida por los cambios de esporulación es igual o incluso superior a la variabilidad intrínseca (Freire et al., 2023). Debido a esto, es necesario tener información cuantitativa no solo de la variabilidad inter e intraespecífica sino también sobre el impacto de las condiciones de esporulación en la variabilidad de la resistencia al calor de los esporos que pueden contaminar los alimentos.

La temperatura de esporulación es uno de los factores más influyentes. Generalmente, los esporos son más resistentes al calor cuanto mayor es la temperatura de incubación. Esto se ha atribuido al menor contenido en agua, mayor contenido en DPA y en minerales en el protoplasto

(Beaman y Gerhardt, 1986). Además, los esporos producidos a distintas temperaturas de esporulación tienen diferencias estructurales en la cubierta proteica y córtex que podrían también contribuir a los cambios en termorresistencia (Melly et al., 2002).

Los cambios de pH y a_w del medio de esporulación también modifican la resistencia al calor de los esporos. Los esporos producidos en pH ácido son más sensibles que los producidos a pH neutro, lo que se ha atribuido a cambios en el grado de mineralización del núcleo (Kihm et al., 1990). Aunque el efecto de la a_w no está bien definido existen estudios que indican que el descenso de la a_w del medio incrementa la resistencia de los esporos al calor dependiendo del soluto utilizado (Freire et al., 2023). Finalmente, cabe destacar que los esporos procedentes de biofilms muestran mayor resistencia al calor que los esporos obtenidos en un cultivo planctónico, lo que tiene mucha relevancia para la industria productora de alimentos deshidratados, ya que los biofilms que se pueden formar en los equipos es una fuente importante de contaminación (Huang, Flint y Palmer, 2021).

1.3.3.3 Propiedades del medio de tratamiento

Otro punto importante que se debe considerar a la hora de estimar la resistencia al calor de los esporos son las características físico-químicas del medio de tratamiento, como el pH, la a_w y la composición (Wells-Bennik et al., 2016). Los esporos son más sensibles al calor en medio ácido que en medio neutro. Por ello, el pH de los alimentos es un factor clave a la hora de optimizar los tratamientos térmicos, ya que la acidificación de productos que toleran la acidez permite reducir la intensidad de los tratamientos. La influencia de los cambios de pH en la resistencia térmica de los esporos varía mucho dependiendo de la especie e incluso entre distintas cepas, existiendo algunas menos susceptibles a los cambios de pH. Las variaciones en termorresistencia debidas a cambios de pH están fuertemente ligadas a las condiciones de esporulación y la intensidad del tratamiento aplicado. Sala et al. (1995) observaron que los esporos de *B. subtilis* obtenidos a la temperatura óptima de crecimiento, eran 6 veces más resistentes al calor a pH 7 que a pH 4. Sin embargo, si estos esporos se obtenían a una temperatura de 52 °C, el efecto del pH no era constante y disminuía conforme aumentaba la temperatura de calentamiento, siendo despreciable por encima de los 120 °C (Palop, Mañas y Condón, 1999).

Murrell y Scott (1966) estudiaron el aumento de la resistencia de los esporos debido a la disminución de la a_w del medio de tratamiento, demostrando que esporos de *B. megaterium* mostraban mayores valores $D_{100\text{ °C}}$ al disminuir la a_w del medio con la adición de sales inorgánicas. El máximo de termorresistencia se alcanzó a una a_w de entre 0,2 y 0,4 con unos valores $D_{100\text{ °C}}$ hasta 10.000 veces superior con respecto al valor obtenido a una a_w próxima a 1. Estudios posteriores han demostrado que la magnitud del incremento de la termorresistencia debido a

la reducción de la a_w depende del soluto utilizado. Por ejemplo, Coroller, Leguérinel y Mafart (2001) mostraron que al reducir la a_w a 0,90, el valor $D_{95\text{ °C}}$ aumentó 6,8 veces cuando se añadió sacarosa, 2,8 veces cuando se adicionó glicerol y 2,6 veces en presencia de glucosa.

1.4 Deshidratación

1.4.1 Métodos de deshidratación industriales

La deshidratación es una de las técnicas más ampliamente utilizadas para la conservación de alimentos. Consiste en reducir la a_w hasta niveles que inhiban o desaceleren lo máximo posible el crecimiento microbiano y la actividad de las enzimas y reacciones químicas alterantes. Esta técnica se ha ido desarrollando a lo largo de los años desde sus inicios hace más de 5000 años en la zona de Mesopotamia y el antiguo Egipto. Hoy en día se utilizan equipos industriales automatizados que permiten deshidratar los alimentos en menor tiempo, de forma más homogénea, y obteniendo mayor calidad sanitaria, nutricional y sensorial del producto final con respecto al secado tradicional realizado al sol o al aire. Algunos de los métodos de secado industriales más empleados son el secado por convección de aire, el secado de tambor, el secado a vacío y la liofilización. Cada uno de estos métodos tiene una serie de ventajas e inconvenientes, por lo que según el producto final que se quiera elaborar se elegirá un método u otro.

En el secado por aire caliente, el alimento se expone a una corriente de aire a temperaturas en torno a 150 °C. El aire a estas temperaturas transmite el calor necesario para la evaporación del agua por convección. Se aplica a productos como frutas, vegetales y especias. Tiene la ventaja de que permite un secado rápido a un bajo coste, aunque es más difícil de controlar la calidad del producto final respecto a otros tipos de secado al utilizar temperaturas de tratamiento más elevadas (Inyang, Innocent y Etuk, 2017).

Con el fin de reducir la temperatura del aire para deshidratar productos termosensibles, como los concentrados de fruta, y ahorrar energía, el secado se puede realizar a vacío. Al disminuir la presión se consigue reducir el punto de ebullición del agua por debajo de 100 °C, permitiendo así una deshidratación rápida a menor temperatura. El secado a vacío permite obtener productos con una mayor porosidad y una menor pérdida de los aromas volátiles y deterioro del color, además de tener un mejor valor nutricional con respecto a productos deshidratados por aire caliente convencional (Inyang, Innocent y Etuk, 2017).

Un tipo especial de secado es la atomización por aspersión o “spray drying”. En esta técnica se consigue transformar alimentos en estado fluido, bien formando suspensiones, disoluciones o emulsiones, en polvos, gránulos o aglomerados, dependiendo de las propiedades físico-químicas del producto y de las condiciones del tratamiento. Para esto, el flujo líquido de entrada se pulveriza en finas gotas a través de una boquilla con una corriente de vapor caliente y el sólido

se va formando a medida que el agua se evapora. Para que estas gotas sean lo más pequeñas posibles, se puede utilizar una o varias boquillas que se deben elegir de acuerdo con el material y caudal para maximizar la transferencia de calor y la tasa de vaporización de agua. Estas gotas suelen tener un tamaño entre 20 μm y 180 μm . Además, es de gran importancia controlar la temperatura de entrada que se utiliza en este proceso. Normalmente, se suelen utilizar temperaturas entre 150 °C y 220 °C (Singh y Dixit, 2014). A un caudal constante, cuanto mayor es la temperatura del líquido de entrada, menor es el contenido de agua del producto final. Otros factores importantes a controlar son el caudal, el cual interesa que sea el máximo posible y la velocidad del aspirador. El uso de este método en los últimos años está aumentando notablemente, sobre todo en productos como la leche o jugos de fruta en polvo. Uno de los mayores inconvenientes de esta técnica es que los productos con una elevada cantidad de azúcares y ácidos de bajo peso molecular, como los derivados de frutas, requieren la adición de aditivos, como polímeros y gomas, que evite que las partículas más pegajosas se adhieran a la pared reduciendo el rendimiento del producto final (Singh y Dixit, 2014).

La liofilización es un proceso en el que el agua del producto se congela y se elimina primero por sublimación (secado primario) y posteriormente por desorción. La velocidad de congelación es clave ya que de ella dependerá el tamaño de los cristales que se formen y estos deben ser lo suficientemente grandes como para conseguir el menor tiempo de sublimación posible. La velocidad de secado en la etapa de desorción es más lenta que en la de sublimación ya que hay una menor cantidad de agua y una mayor resistencia al calor al estar las moléculas de agua más fuertemente unidas a las sustancias sólidas. En esta etapa es en la que se reduce el contenido de agua del producto final hasta el nivel requerido y adquiere su estructura característica (Nowak y Jakubczyk, 2020). Las ventajas de la liofilización son la gran estabilidad que obtienen los alimentos a temperatura ambiente, su fácil reconstitución al añadir agua, la estructura porosa que obtiene el producto, la reducción del peso que sufre y su fácil manipulación. (Cieurzyńska y Lenart, 2011). Sin embargo, con esta técnica se pueden perder compuestos volátiles siendo el procedimiento más caro de deshidratación. También requiere que el producto se pueda congelar con facilidad sin afectar a sus características organolépticas. Los mejores productos en los que se aplica este tratamiento son aquellos que se encuentran intactos, son resistentes, con poros suficientes, estables químicamente y libres de partículas, como son el café, el té, algunas frutas y verduras y hierbas aromáticas (Inyang, Innocent y Etuk, 2017).

La deshidratación osmótica es otro método de reducción de la a_w de los alimentos, que se consigue con la salida del agua a través de las membranas celulares por la adición de solutos. Esto se produce debido a que las membranas celulares son semipermeables, produciéndose un

proceso dinámico en el que primero se elimina el agua y el ácido del alimento y posteriormente penetra el soluto progresivamente a lo largo del tiempo. Para esta deshidratación es muy importante controlar el tiempo de inmersión, la temperatura de la solución osmótica, el agente osmótico que se utiliza y la concentración de esta solución osmótica. Además, para optimizar este tipo de tratamiento hay que conocer la cinética de deshidratación osmótica, estimando la tasa de eliminación de agua y la ganancia de sólidos. Este método se utiliza sobre todo para la conservación de frutas y verduras, obteniendo una vida útil de entre 6 y 12 meses. Es un proceso simple y económico en comparación con otros métodos de secado y previene el pardeamiento enzimático, permitiendo conservar la integridad de los productos al no requerir un cambio de fase ni una temperatura elevada, reteniendo su color y sabor (Yadav y Singh, 2014).

1.4.2 Efecto de la deshidratación en la termorresistencia de los esporos

A pesar de la gran importancia que tienen los esporos en los productos deshidratados, se han realizado muy pocos estudios sobre el efecto de los procesos de deshidratación en sus propiedades. La mayoría de los estudios se centran en el efecto del método de deshidratación en la supervivencia de los esporos, pero hay una falta de conocimiento notable sobre la resistencia y capacidad de germinación de los esporos supervivientes.

Las investigaciones en las que se ha estudiado la inactivación de los esporos por la deshidratación se centran en dos procesos: el secado por aspersion y la liofilización. En la mayoría de ellos se demuestra que la liofilización apenas daña a los esporos, mientras que el secado por aspersion puede llegar a inactivarlos dependiendo de los parámetros de procesado empleados. Zhou et al. (2008) estudiaron la inactivación de esporos de *B. thuringensis* con secado por aspersion al variar la temperatura del aire de entrada, la temperatura del aire de salida y la presión del aire de atomización. Aunque los tres parámetros influían en la inactivación, la temperatura de salida resultó ser el factor más importante a controlar debido a su menor valor de z. Por último, compararon la viabilidad de los esporos deshidratados por distintos métodos observándose que los esporos deshidratados por horno tenían una menor supervivencia en comparación con los deshidratados por liofilización o aspersion a bajas temperaturas. Los esporos de estos dos últimos tipos de deshidratación tenían una viabilidad similar. Luangthongkam et al. (2021) observaron que la inactivación de los esporos de *B. amyloliquefaciens* H57 por secado por aspersion a una temperatura baja, 80 °C, puede llegar a ser inferior a la de los esporos liofilizados. En este estudio también se analizó si el almacenamiento afectaba a la supervivencia de los esporos tratados por ambos tipos de deshidratación tras 50 días de almacenamiento, concluyendo que los esporos secados por aspersion y almacenados a 4 °C mantenían mayor viabilidad. Alvarenga et al. (2018a)

demonstraron que la naturaleza del medio de tratamiento tiene gran influencia en la resistencia de los esporos de *B. cereus* al secado por aspersión, utilizando leche, tampón fosfato y una suspensión de talco. La supervivencia de los esporos fue superior en la suspensión de talco que en los alimentos. La supervivencia al secado por aspersión también depende de la cepa, existiendo gran variabilidad en resistencia entre esporos de *B. cereus* (Alvarenga et al., 2018b).

El único estudio en el que se ha analizado la termorresistencia de esporos deshidratados es el realizado por Odlaug, Caputo y Graham (1981), en el cual se liofilizaron esporos en un tampón fosfato 0,067 M y se almacenaron a temperaturas entre 2 °C a 8 °C durante 9 a 27 meses. Tras el almacenamiento, los esporos se resuspendieron en el tampón o una solución salina al 0,9 % y se determinó su resistencia al calor. Se observó que los esporos liofilizados mantuvieron la misma termorresistencia que antes de ser deshidratados, a pesar de que el proceso redujo ligeramente la población. También observaron que la termorresistencia de los esporos liofilizados prácticamente no variaba a lo largo del tiempo de almacenamiento. En otro estudio de Tiburski et al. (2014) se investigó la estructura de los esporos deshidratados en una solución de glicerol de a_w 0,13 antes y después de aplicar un tratamiento térmico con calor seco utilizando espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Se observó que los esporos que habían perdido gran parte del agua del núcleo tenían una resistencia al calor muy superior con respecto a aquellos que estaban hidratados, pudiendo llegar a germinar cuando se incubaban en condiciones favorables. Los espectros FTIR mostraron que los esporos hidratados carecían de los picos relacionados con el DPA, lo que podría indicar la ruptura de la corteza y la membrana interna. Los picos de la estructura de las proteínas también variaron, pudiendo ser un indicativo de la desnaturalización y pérdida de la actividad de una o varias proteínas o enzimas clave para la germinación. No se observaron ninguna de estas modificaciones en los esporos deshidratados. La conservación de la estructura interna del espora deshidratado solo se ha observado tras aplicar un tratamiento con calor seco, pero no se ha estudiado en respuesta al calor húmedo, que es el que predomina en la inactivación de los esporos en alimentos.

2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El control de las bacterias esporuladas es un gran desafío para la industria alimentaria debido a la elevada resistencia de los esporos a la mayoría de los métodos de conservación y a su germinación en los alimentos, causando deterioro e incluso toxiinfecciones alimentarias si se encuentran cepas de *Bacillus* y *Clostridium* patógenas. En la actualidad, el tratamiento térmico a alta intensidad (a temperaturas > 100 °C durante unos pocos segundos o minutos) es el único procedimiento para inactivar las formas esporuladas hasta alcanzar los estándares de estabilidad adecuados para productos almacenados a temperatura ambiente. Sin embargo,

estos afectan negativamente a la calidad organoléptica y sensorial de los alimentos. Por ello, la intensidad del tratamiento térmico que se aplica en la industria suele ser la mínima posible para controlar los microorganismos esporulados. Debido a la alta variabilidad en la resistencia al calor entre las especies y cepas de esporos y que cada alimento posee una flora esporulada específica, que las propiedades físico-químicas de cada alimento afectan a la termorresistencia de los esporos y que el efecto del calor en los parámetros de calidad es distinto en cada alimento, la intensidad del tratamiento térmico a aplicar tiene que ser cuidadosamente optimizada en cada caso. En general, la optimización de los tratamientos térmicos incluye un estudio de la cinética de inactivación de la cepa esporulada contaminante más termorresistente en un laboratorio, donde se utilizan medios y condiciones de cultivo óptimas para obtener los esporos, que posteriormente se almacenan en condiciones ideales, lo que hace que en la práctica en ocasiones no se alcance el objetivo de estabilidad del producto esperado.

En el grupo de investigación donde se ha realizado este trabajo (A03_23R - Nuevas Tecnologías de Procesado de los Alimentos), el cual asesora a empresas para la optimización de tratamientos térmicos, se han aislado e identificado cepas esporuladas que sobrevivían mucho más de lo esperado a los tratamientos térmicos preestablecidos en el laboratorio. En uno de los casos estudiados en colaboración con el Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria (CNTA), se aislaron dos cepas pertenecientes a *Bacillus* spp. que sobrevivían con facilidad a los tratamientos térmicos diseñados para su control en harinas vegetales. Los esporos de estas cepas que se encontraban contaminando el alimento mostraron un valor $D_{100\text{ }^{\circ}\text{C}}$ entre 5 y 10 veces superior que cuando los esporos se cultivaban en el laboratorio y se añadían artificialmente al producto (datos proporcionados por el CNTA). Recientemente, otros investigadores han observado que este hecho ocurre con frecuencia en productos elaborados con materias primas en polvo de origen vegetal (Eijlander, Kyrylenko y Wells-Bennik, 2023). Estas materias primas se someten a un proceso de deshidratación, en muchos casos a temperaturas elevadas, por métodos distintos en función del tipo de producto (secado por atomización, secado por lecho fluidificado, secado por tambor...), los cuales son capaces de inactivar la mayoría de las bacterias en sus formas vegetativas, pero no los esporos.

Nuestra hipótesis de trabajo es que los procesos de deshidratación podrían modificar ciertas propiedades de los esporos, como el contenido en agua del protoplasto o la estructura de las capas protectoras, pudiendo hacerles más resistentes al calor. Por tanto, el objetivo de este trabajo es determinar si la deshidratación de los alimentos modifica la termorresistencia de los esporos, y si influye el método de deshidratación empleado. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- Determinar el efecto de la deshidratación osmótica en la resistencia al calor de los esporos, estudiando a su vez el efecto de la a_w , la temperatura y el tiempo del proceso de deshidratación.
- Determinar el efecto de la deshidratación por dos métodos físicos, centrifugación a vacío y secado por aspersión, en la resistencia al calor de los esporos.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Microorganismo y condiciones de cultivo

Las suspensiones de esporos se obtuvieron a partir de una cepa de *B. subtilis* aislada de una harina vegetal en el CNTA. La cepa se almacenaba en un criovial a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, la cual se revitalizó en una placa de agar nutritivo suplementado con un 0,6 % de extracto de levadura (NAYE; Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Para la esporulación, se preparó un precultivo inoculando una colonia de la estría en un bote estéril con 70 mL de caldo nutritivo con extracto de levadura al 0,6 % (NBYE; Oxoid), que se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12 horas en agitación orbital a 130 rpm (Unimax 2010, Heidolph, Acwabach, Alemania) en una estufa de aire forzado (PSELECTA, Barcelona, España). De este precultivo se sembraron 0,1 mL en la superficie de 70 placas cuyo medio contenía caldo nutritivo (NB; 8,8 g/L), agar bacteriológico (15 g/L; Oxoid) y las siguientes sales: 0,25 M de MgCl_2 (PanReac, Barcelona, España), 3,0 M de CaCl_2 (VWR Chemicals, Pensilvania, Estados Unidos) y 0,04 M de MnSO_4 (PanReac). Las placas se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se determinó a lo largo del tiempo el porcentaje de esporulación para determinar el tiempo óptimo de incubación. El porcentaje de esporulación se determinó microscópicamente (Nikon Eclipse E400, Tokyo, Japón), a partir de la proporción de esporos formados respecto al número total de células vegetativas. Como se observa en la Figura 2, el porcentaje de esporulación aumentó progresivamente estabilizándose a partir de las 30 horas pero se mantuvo hasta las 45 horas, para asegurar el máximo porcentaje de incubación posible.

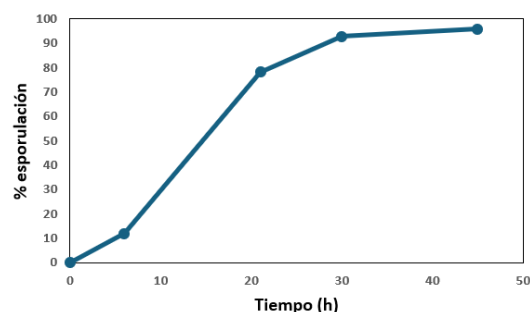


Figura 2. Evolución del porcentaje de esporulación a lo largo del tiempo.

Para la obtención y purificación de las suspensiones de esporos se rascó la superficie de las placas de esporulación añadiendo agua destilada estéril. Los esporos obtenidos se llevaron a 4

tubos Falcon y se lavaron con agua destilada 4 veces centrifugando a 4 °C y 3345 g durante 20 minutos (Heraeus Megafuge 1.0R, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Se comprobó la pureza de las suspensiones en el microscopio (> 90 % esporos libres), y se determinó la concentración por recuento en cámara de Thoma (10^{10} esporos/mL). Los esporos se conservaron a 4 °C en agua destilada hasta su uso.

3.2 Métodos de deshidratación físicos

Las suspensiones de esporos se deshidrataron por dos procedimientos alternativos: centrifugación a vacío y secado por atomización. En los dos casos se empleó como medio de tratamiento una solución de maltodextrina (SOC Chef, Tárrega, España) tampón citrato-fosfato (McIlvaine) de pH 7,0 al 10 % (p/v). Esta solución se contaminó con aproximadamente 5×10^8 esporos/mL. Tras finalizar el proceso se midió la a_w del producto con un Aqualab (Pullman, Estados Unidos), así como la concentración de esporos supervivientes.

Para la centrifugación a vacío se utilizó un rotavapor DNA-23050-B00 (Genevac, Madrid, España). Se rellenaron 48 tubos Eppendorf con 1 mL cada uno de la disolución con esporos que se centrifugaron 22 horas a 37 °C. Tras el tratamiento se recogieron los pellets (Figura 3A). El producto final alcanzó una a_w de 0,465 y una concentración de esporos de $4,04 \times 10^8$ esporos/g.

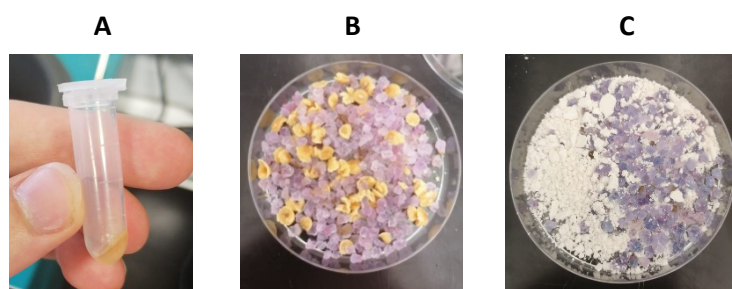


Figura 3. (A) Pellet con esporos deshidratados por centrifugación a vacío; (B) esporos almacenados con sílica gel tras deshidratación por centrifugación a vacío y (C) esporos almacenados con sílica gel tras deshidratación por secado por aspersión.

Para el secado por aspersión se utilizó el equipo Mini Spray Dryer B-290 (BÜCHI, Shanghai, China), disponible en el servicio del Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2). Primero se optimizaron las condiciones de tratamiento (temperatura de entrada, caudal y fuerza de aspiración) del tratamiento a aplicar a la solución de maltodextrina para obtener la a_w más baja. Las condiciones seleccionadas fueron: temperatura de entrada: 100 °C, caudal: 11 mL/min, fuerza de aspiración: 80 %. En estas condiciones, la temperatura de salida fue de 43 °C. El producto final alcanzó una a_w de 0,275 y una concentración de esporos de $1,04 \times 10^8$ esporos/g.

Ambos productos deshidratados se almacenaron en un bote estéril con sílica gel para evitar la rehidratación a temperatura ambiente (Figuras 3B y 3C).

3.3 Método de deshidratación químico

Por otro lado, también se probó a deshidratar los esporos en soluciones concentradas de glicerol (PanReac). Para ello se prepararon disoluciones de 25 mL de una a_w de 0,30, 0,50, 0,70 y 0,90. Las cantidades a añadir tanto de glicerol como de agua fueron determinadas con la Ec. [1], donde n_d son los moles de disolvente, que en este caso será el agua destilada, y n_s serán los moles de soluto, que será el glicerol. La a_w se comprobó midiendo con el equipo Aqualab.

$$a_w = \frac{p}{p_0} = X = \frac{n_d}{n_s + n_d} \quad \text{Ec. [1]}$$

Las soluciones de glicerol ajustadas a la a_w deseada se esterilizaron en frascos de 25 mL dejando el mínimo espacio de cabeza. Después, cada uno de los botes se contaminó con esporos a una concentración de 2×10^7 esporos/mL, para determinar la resistencia al calor a punto final, o de 10^8 esporos/mL, para determinar la cinética de inactivación por calor (ver apartado 3.4). Los frascos se almacenaron a distintas temperaturas (8 °C, 20 °C, 26 °C, 30 °C, 40 °C, 60 °C y 80 °C), de forma que hubiera una muestra de cada a_w a cada temperatura, y se midió la termorresistencia de los esporos a distintos tiempos (entre 0 y 19 días).

3.4 Tratamientos térmicos

La resistencia al calor se determinó por dos procedimientos: a punto final utilizando un equipo de PCR para poder comparar la inactivación de un elevado número de muestras, y en un termorresistómetro para obtener la cinética de inactivación a distintas temperaturas. El medio de tratamiento para los dos métodos fue el tampón McIlvaine a pH 7,0.

Para determinar la inactivación a punto final, las muestras se diluyeron en el medio de tratamiento hasta alcanzar una concentración de 2×10^5 esporos/mL. Después se depositaron 70 μ L de cada muestra en un Eppendorf de PCR. Los tratamientos se realizaron en un equipo VeritiPro (Thermo Fisher Scientific) a una temperatura de 100,0 °C, manteniendo la temperatura de la tapa a 105,0 °C. Para determinar el tiempo óptimo de tratamiento se realizó en primer lugar una curva de supervivencia a esta temperatura (Figura 4). Para ello se utilizó un Eppendorf para cada tiempo de tratamiento, del cual se sembraron 50 μ L de la muestra, tal y como se describe en el apartado 3.5. A partir de los resultados, se fijó el tiempo de tratamiento en 2 minutos, punto en el cual la inactivación era de aproximadamente 1,5 ciclos logarítmicos.

Para determinar la cinética de inactivación, se empleó un termorresistómetro (Equipo Mastía, Universidad Politécnica de Cartagena). Este termorresistómetro está formado por los siguientes componentes: un recipiente de 400 mL de volumen donde se realiza el tratamiento térmico, un sistema de inyección para inocular los microorganismos y un sistema de extracción de muestra con una válvula solenoide. Además, en el interior del recipiente hay una sonda de

temperatura, un sistema de calentamiento eléctrico con bobina, un sistema de refrigeración y un sistema de agitación con hélice para controlar y homogeneizar la temperatura de tratamiento. La cámara de tratamiento está conectada a una fuente de gas N_2 controlada con un manómetro para poder trabajar a sobrepresión y así impedir que el medio de tratamiento ebulle a temperaturas superiores a $100\text{ }^\circ\text{C}$, y para poder extraer la muestra.

Antes de aplicar el tratamiento térmico, se esterilizó la cámara y el medio de tratamiento a $120\text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 minutos. Tras esto, se atemperó a la temperatura de trabajo ($100,0\text{ }^\circ\text{C}$, $102,5\text{ }^\circ\text{C}$ o $105,0\text{ }^\circ\text{C}$) y se ajustó la presión para que el volumen de extracción fuera de $0,2\text{ mL}$ por muestra. Para la inoculación de microorganismos, se usaron las suspensiones diluidas hasta una concentración de 10^8 esporos/mL y se inyectaron $0,2\text{ mL}$ en el termorresistómetro. Una vez inoculado, se fueron extrayendo muestras a los tiempos deseados en placas de Petri estériles.

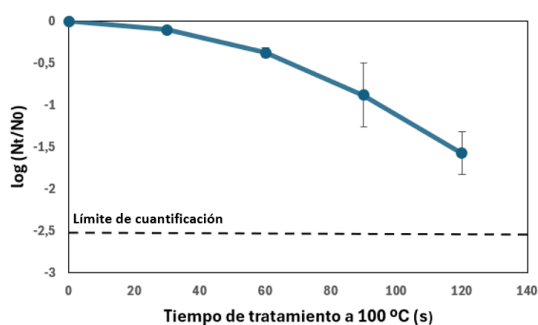


Figura 4. Gráfica de supervivencia a $100,0\text{ }^\circ\text{C}$ de esporos de *B. subtilis* realizada en la máquina PCR. Los datos representan la media de dos réplicas biológicas y las barras de error, la desviación estándar de las medidas. La línea punteada corresponde al límite de cuantificación (10 UFC/placa).

3.5 Recuperación y recuento de supervivencia

Los esporos se recuperaron por homogeneización en masa en NAYE. Las placas se incubaron 24 horas a $37\text{ }^\circ\text{C}$. El número de colonias por placa se determinó con un contador de colonias por análisis de imagen (Protos, Analytical Measuring Systems, Cambridge, Reino Unido). El límite de cuantificación se fijó en 10 UFC por placa.

3.6 Modelización de los datos de los datos

Una vez obtenidos los recuentos, se elaboraron las gráficas de supervivencia. En estas gráficas se representó la fracción de supervivientes como $\log(N_t/N_0)$, donde los valores N_t y N_0 representan el número de UFC por placa a un determinado tiempo y al inicio del tratamiento respectivamente, frente al tiempo (s) a una temperatura determinada. La cinética de inactivación de estas gráficas se ajustó al modelo “log-linear + shoulder” de Geeraerd, Herremans y Van Impe (2000). Con este modelo se obtienen los siguientes parámetros de resistencia: K_{\max} que es la constante de inactivación de la fase de inactivación logarítmica y SI

que es la longitud del hombro (Ec. [2]). La modelización de las curvas de supervivencia se realizó a partir del software GInaFIT (Geeraer, Valdramidis y Van Impe, 2005; KU Leuven, Bélgica).

$$\log N_t = \log N_0 - \frac{K_{max} t}{\ln 10} + \log \left(\frac{e^{K_{max} Sl}}{1 + (e^{K_{max} Sl} - 1)e^{-K_{max} t}} \right) \quad \text{Ec. [2]}$$

A partir de la Ec. [3] se obtuvieron los valores D_T :

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

El valor z se calculó a partir de la inversa negativa de la pendiente de la gráfica de termodestrucción obtenida al representar el logaritmo del valor D_T frente a la temperatura de tratamiento correspondiente.

Para estudiar la influencia de la a_w y temperatura de incubación en la resistencia al calor de los esporos deshidratados por el procedimiento químico, los resultados se analizaron mediante regresión múltiple utilizando el método de superficie de respuesta (Design-Expert versión 13, Stat-Ease, Minneapolis, Minnesota, Estados Unidos). Los datos se ajustaron a un modelo cuadrático cuya respuesta consideraba la influencia de cada factor individualmente (a_w y T), sus interacciones ($a_w \times T$) y su efecto cuadrático (a_w^2 y T^2):

$$Y = b_0 + b_1 \cdot a_w + b_2 \cdot T + b_3 \cdot a_w \cdot T + b_4 \cdot a_w^2 + b_5 \cdot T^2 \quad \text{Ec. [4]}$$

donde Y es la variable de respuesta (cambio de la termoresistencia de los esporos con respecto al control a 100,0 °C tras 2 min de tratamiento) y b_n , los coeficientes de regresión de cada variable. Los parámetros del modelo que no resultaron estadísticamente significativos mediante un análisis de varianza ($P > 0,05$) se suprimieron por un procedimiento de eliminación progresiva hacia atrás. Para evaluar la bondad de los ajustes, se estimó el coeficiente de determinación (R^2) y la raíz del error cuadrático medio (RECM).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resistencia al calor de los esporos sometidos a deshidratación osmótica con glicerol

4.1.1 Influencia de la actividad de agua y la temperatura

Inicialmente, se determinó la resistencia al calor por el método de punto final de los esporos deshidratados en soluciones de glicerol con distintas a_w y temperaturas de incubación tras 7 días de almacenamiento. Para su análisis se aplicó un tratamiento térmico de 100,0 °C durante 2 minutos en una máquina de PCR. Este tratamiento resultó en una inactivación ($\log(N_0/N_t)$) promedio de las muestras control, preparadas con los esporos almacenados en agua destilada ($a_w 0,99$) a 4 °C, de 1,57 ciclos logarítmicos, tal y como se optimizó el tratamiento (Figura 4). En

un primer experimento, los esporos se incubaron a a_w de 0,30; 0,50; 0,70; 0,90 y 0,99 (esta última sin la adición de glicerol) y cada una de las soluciones se almacenó a temperaturas de 20 °C, 40 °C, 60 °C y 80 °C. En la Figura 5 se muestra la resistencia al calor a las distintas a_w y temperaturas.

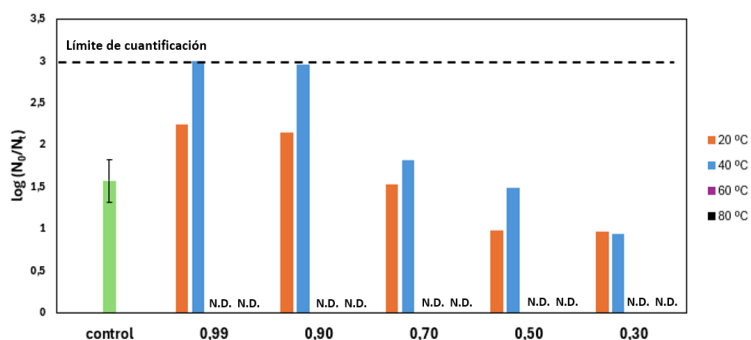


Figura 5. Reducciones logarítmicas ($\log(N_0/N_t)$) obtenidas tras un tratamiento a 100,0 °C durante 2 min de las suspensiones de esporos de *B. subtilis* deshidratadas en soluciones de glicerol a distintas a_w (0,30; 0,50; 0,70; 0,90 y 0,99) almacenadas a 20 °C, 40 °C, 60 °C y 80 °C durante 7 días. Los datos del control representan la media y la desviación estándar de 9 valores de las muestras inoculadas con esporos almacenados en agua destilada (a_w 0,99) a 4 °C. La línea punteada se corresponde con el límite de cuantificación (10 UFC/placa). N.D.: no determinado, no se pudo realizar la termoresistencia de estas muestras porque las condiciones de almacenamiento reducían la supervivencia de los esporos por debajo del límite de cuantificación.

Los resultados obtenidos reflejan grandes variaciones dependiendo de la a_w y temperatura de almacenamiento. En el caso de los esporos almacenados a 40 °C y una a_w de 0,99, sin la adición de glicerol, el recuento de supervivientes tras el tratamiento térmico fue inferior a 10 UFC/placa, lo que se corresponde con una inactivación de más de 3 reducciones logarítmicas (Figura 5). Los esporos almacenados a la misma a_w a 20 °C, también perdieron resistencia al calor en comparación con el control pero en menor proporción al comparar con los incubados a 40 °C (0,65 vs. > 1,43 ciclos logarítmicos). Sin embargo, la resistencia de los esporos almacenados a 40 °C y 20 °C aumentó progresivamente con la a_w del medio hasta 0,30. Este efecto fue superior en los esporos incubados a 40 °C, cuya inactivación pasó de > 3,0 ciclos logarítmicos a a_w 0,99 a 0,93 ciclos logarítmicos a a_w 0,30. En esta última a_w , los esporos incubados tanto a 20 °C como a 40 °C presentaron una resistencia superior de 0,65 ciclos logarítmicos con respecto al control.

La viabilidad de los esporos que se almacenaron a 60 °C y 80 °C, a cualquiera de las a_w , fue inferior al límite de cuantificación, y por tanto no se pudo determinar su resistencia al calor. Con el fin de comprobar si estos esporos eran realmente inviables o sufrían cambios estructurales que les impedían iniciar la germinación en presencia de los nutrientes del medio de cultivo, los esporos incubados a estas temperaturas se trataron con CaDPA (50 mM DPA y 50 mM CaCl₂ en

tampón 5mM HEPES a pH 7,0; Freire, Condón y Gayán, 2024) durante tiempos entre 0 y 90 min a 37 °C, antes de ser sembrados en placa. El CaDPA es un germinante químico capaz de inducir la germinación en aquellos esporos que no responden bien a nutrientes, llamados esporos superlatentes, mediante la activación de la enzima lítica del córtex CwlJ (Paidhungat y Setlow, 2000). Según Ghosh et al. (2009), los esporos superlatentes tienen un menor contenido de agua en el núcleo en comparación con los esporos latentes originales y, por tanto, la deshidratación osmótica podría provocar defectos en la germinación. Sin embargo, el tratamiento con CaDPA no consiguió restaurar la supervivencia de los esporos que habían sido almacenados a 60 °C y 80 °C (datos no mostrados), indicando que probablemente sean inviables. Estos resultados concuerdan con los publicados por Liang et al. (2019), quienes observaron que los esporos de *G. stearothermophilus* se morían cuando se incubaban en tampón fosfato (pH 7,4, a_w 0,99) a temperaturas entre 65 °C y 98 °C, siendo mayor la velocidad de muerte a mayor temperatura. La inactivación de los esporos se correlacionó con el grado de racemización del ácido aspártico. Por ello, los autores atribuyeron la mortalidad de los esporos a su incapacidad para restaurar el ácido aspártico durante el estado de latencia, acumulando el daño hasta niveles imposibles de reparar tras germinar. Además, observaron que la velocidad de racemización del ácido aspártico en *B. subtilis* era similar que en *G. stearothermophilus*, por lo que la pérdida de viabilidad observada en este estudio a altas temperaturas de incubación podría deberse a este fenómeno.

En vista de estos resultados, se realizó un segundo experimento en el que se volvió a estudiar la resistencia al calor por el método de punto final en esporos deshidratados con glicerol a las mismas a_w , pero en este caso se almacenaron en un rango de temperaturas inferior: 8 °C, 26 °C, 30 °C y 40 °C. Se determinó la termorresistencia cada 2-6 días para evaluar cómo cambiaba a lo largo del tiempo. En la Figura 6 se muestran los cambios en la resistencia al calor a lo largo del tiempo de los esporos almacenados a las distintas temperaturas y a_w , expresada como la diferencia entre el número de reducciones logarítmicas (RL; $\log(N_0/N_t)$) obtenidas en cada condición (RL_n) y el control (RL_c) de cada día de almacenamiento. De esta forma, los valores de RL_n - RL_c positivos indican un descenso de la termorresistencia, mientras que los valores negativos representan un incremento de la misma. Se consideró que los cambios en termorresistencia eran relevantes cuando estos superaban al intervalo de confianza (95 %) de la inactivación de los controles obtenida a los distintos días de almacenamiento.

Como se observa en la Figura 6A y 6B, los esporos incubados a 40 °C a las a_w más altas (0,99 y 0,90) perdieron progresivamente resistencia al calor respecto al control almacenado a 4 °C. La inactivación de estas muestras se estabilizó alrededor de los 7-9 días, siendo aproximadamente 0,94 y 1,08 ciclos logarítmicos más sensibles que el control. En las muestras deshidratadas a una

a_w de 0,70 se detectó que la resistencia de los esporos almacenados a 26 °C aumentó 0,67 ciclos logarítmicos con respecto al control a partir del día 13 (Figura 6C).

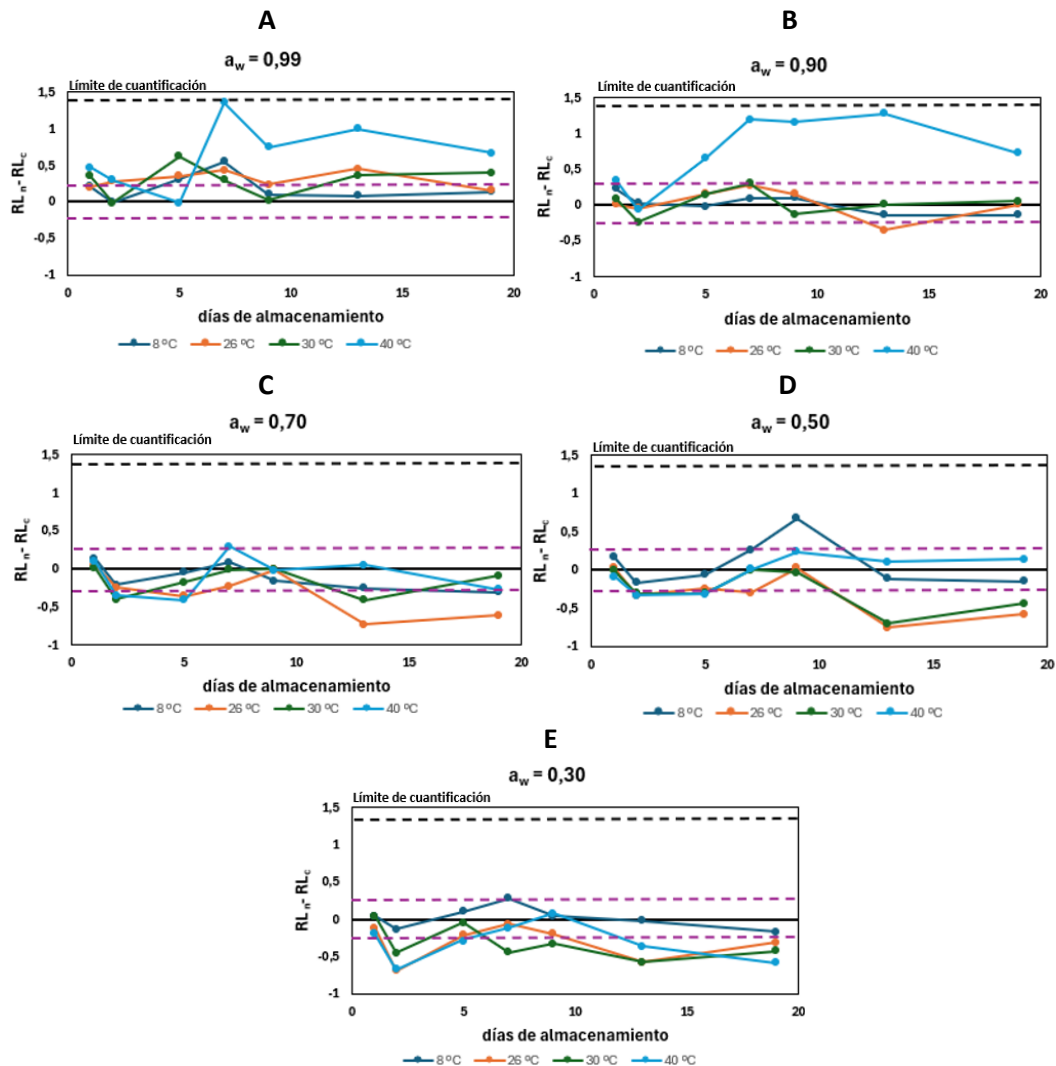


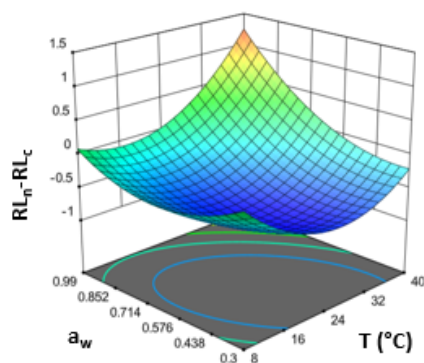
Figura 6. Cambio de la resistencia a un tratamiento a 100,0 °C durante 2 min de los esporos deshidratados en soluciones de glicerol con distinta a_w (A: 0,99, sin la adición de glicerol, B: 0,90, C: 0,70, D: 0,50, E: 0,30) en función del tiempo de almacenamiento a distintas temperaturas (8 °C, 26 °C, 30 °C y 40 °C). Los cambios en resistencia se expresan como la diferencia entre el número de reducciones logarítmicas de cada muestra (RL_n) y el control (RL_c) de cada tratamiento (preparado con esporos almacenados en agua destilada – a_w 0,99 – a 4 °C). Las líneas punteadas moradas representan el intervalo de confianza (95 %) de la inactivación de todos los controles. La línea punteada negra indica el máximo de cambio en la inactivación que se podía observar de acuerdo al límite de cuantificación (10 UFC/placa).

El mismo incremento en termorresistencia, en el mismo rango de tiempo y temperatura, se observó en las muestras deshidratadas a una a_w de 0,50, tanto a 26 °C como a 30 °C (Figura 6D). En el caso de los esporos deshidratados a una a_w de 0,30 (Figura 6E), desarrollaron resistencia al

calor entre el día 9 y 13 a temperaturas de 26 °C, 30 °C y 40 °C. Por tanto, a temperaturas de almacenamiento bajas (4 °C - 8 °C), la termorresistencia de los esporos se mantuvo estable a lo largo del tiempo, independientemente de la a_w del medio. El aumento de la temperatura de almacenamiento de 4 °C a 40 °C de los esporos que se encontraban en un medio de una a_w elevada (0,90 - 0,99) provocó la pérdida de resistencia al calor hasta estabilizarse alrededor de los 7-9 días. Sin embargo, aquellos que se conservaban a una a_w entre 0,70 y 0,30 desarrollaron termorresistencia dependiendo de la temperatura de almacenamiento en un rango de 26 °C a 40 °C. Las temperaturas de incubación más altas (30 °C - 40 °C) permitieron que los esporos adquirieran resistencia a las a_w más bajas (0,50 - 0,30).

A partir de los datos de inactivación ($RL_n - RL_c$) obtenidos a los 13 días de almacenamiento, punto en el cual se estabilizaba la resistencia al calor en todas las condiciones de almacenamiento (Figura 6), se realizó un modelo de regresión múltiple que nos permitiera evaluar la influencia de la a_w , temperatura y sus interacciones. Se obtuvo una ecuación de orden cuadrático (Ec. [5]), en la cual todos los términos resultaron ser significativos ($P > 0,05$). Por lo tanto, los cambios en la resistencia al calor con respecto al control dependían de la a_w del medio y de la temperatura del medio, siguiendo un modelo de segundo orden, y la interacción entre ambos. El coeficiente de determinación (R^2) del modelo fue 0,904. Para validar el modelo, haría falta obtener un nuevo set de datos, lo cual no se pudo realizar por falta de tiempo.

La Figura 7 muestra la relación tridimensional entre los cambios de resistencia, la a_w y la temperatura de incubación. Como se observa, las variaciones más altas en la resistencia al calor provocadas por los cambios en la a_w se producían a las temperaturas más elevadas, alrededor de 40 °C, siendo la inactivación menor cuanto más baja era la a_w . Sin embargo, el mayor incremento en la termorresistencia se observó en un rango de temperaturas entre 16 °C y 35 °C y una a_w de 0,80 y 0,30.



$$RL_n - RL_c = 2,06796 - 0,141881 T - 4,83115 a_w + 0,066321 T a_w + 0,002346 T^2 + 3,32912 a_w^2 \quad \text{Ec. [5]}$$

Figura 7. Gráfico en manta de la influencia de la a_w y temperatura de incubación en los cambios de resistencia ($RL_n - RL_c$) al calor de esporos de *B. subtilis* a los 13 días.

En este trabajo se ha estudiado por primera vez el efecto de la deshidratación osmótica en la resistencia al calor húmedo de esporos bacterianos, observándose que la incubación de los

mismos en un medio de a_w inferior a 0,8 y temperaturas superiores a 16 °C favorecía el aumento de la termorresistencia a los 13 días de almacenamiento. Tiburski et al. (2014) observaron que los esporos de *B. subtilis* deshidratados en una solución de glicerol de a_w 0,13 eran más resistentes al calor seco que los incubados a una a_w elevada, probablemente debido a la deshidratación del núcleo, protegiendo a las proteínas de la desnaturalización y las barreras de permeabilidad de la rotura. Debido a que el mecanismo de acción del calor seco difiere al del calor húmedo (Setlow, 2006), es necesario estudiar los cambios estructurales que sufren los esporos antes y después de un tratamiento con calor húmedo.

4.1.2 Cinética de inactivación por calor de los esporos deshidratados

Posteriormente se estudió la cinética de inactivación por calor en los esporos de *B. subtilis* almacenados en una condición que reducía la resistencia respecto al control y otra que la aumentaba. En concreto, los esporos se almacenaron a una a_w de 0,99 y 0,30 y una temperatura de incubación de 40 °C durante 13 días, ya que en estas condiciones se observaron los mayores cambios en termorresistencia (Figura 6 y Figura 7). Se obtuvo la cinética de inactivación a 100,0 °C, 102,5 °C y 105,0 °C de los esporos incubados y del control preparado con los esporos mantenidos a una a_w de 0,99 a 4 °C (Figuras 8A, 8B y 8C).

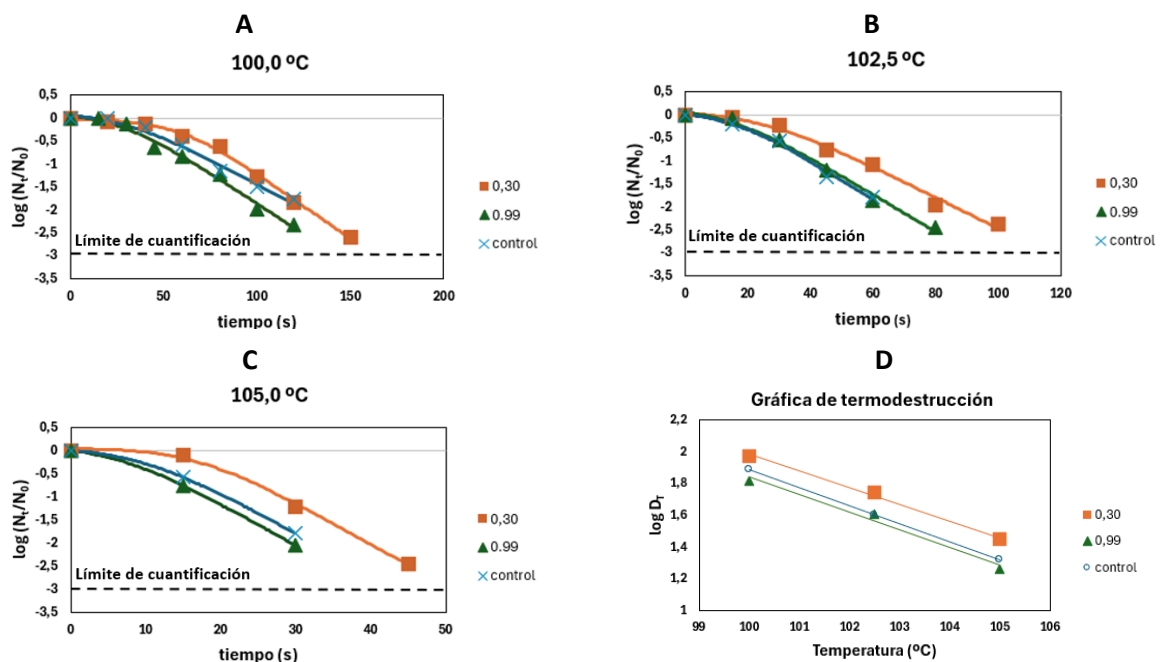


Figura 8. A, B y C) Gráficas de supervivencia de los esporos incubados a una a_w de 0,30 y 0,99 a 40 °C y el control almacenado a 4 °C a distintas temperaturas de tratamiento (A: 100,0 °C, B: 102,5 °C y C: 105,0 °C). La línea punteada se corresponde con el límite de cuantificación (10 UFC/placa). D) Gráfica de termodestrucción de los esporos incubados a una a_w de 0,30 y 0,99 a 40 °C y el control a 4 °C.

En la mayoría de las gráficas de supervivencia se puede ver la presencia de un hombro durante los primeros segundos de tratamiento en los que el recuento se mantiene prácticamente constante. Debido a esto, los datos se ajustaron al modelo “log-lineal + shoulder” de Geeraerd, Herremans y Van Impe (2000), que permite cuantificar y comparar la longitud de hombro (SI) y la velocidad de muerte en la región exponencial (K_{max}) a partir de la Ec. [2]. En la Tabla 1 se encuentran los parámetros SI y K_{max} , junto con los valores D_T calculados para cada temperatura de tratamiento (Ec. [3]).

Tabla 1. Parámetros de resistencia (SI y K_{max}), junto con los correspondientes valores de R^2 y RECM, obtenidos al ajustar las curvas de supervivencia de la Figura 8 al modelo de “log-lineal + shoulder” de Geeraerd, Herremans y Van Impe (2000) (Ec. [2]). Los valores D_T se estimaron a partir de la Ec. [3].

T (°C)	Almacenamiento	SI (s)	K_{max} (s ⁻¹)	R ²	RECM	D _T (s)
100,0	a_w 0,30 (40 °C)	59,14	0,066	0,997	0,064	93,96
	a_w 0,99 (40 °C)	28,25	0,061	0,989	0,110	65,80
	Control (a_w 0,99, 4 °C)	32,47	0,051	0,980	0,110	77,56
102,5	a_w 0,30 (40 °C)	25,50	0,078	0,990	0,120	55,09
	a_w 0,99 (40 °C)	15,90	0,094	0,991	0,122	40,50
	Control (a_w 0,99, 4 °C)	16,93	0,100	0,987	0,122	40,06
105,0	a_w 0,30 (40 °C)	16,93	0,207	0,996	0,118	28,06
	a_w 0,99 (40 °C)	7,22	0,207	N.D.	N.D.	18,32
	Control (a_w 0,99, 4 °C)	9,61	0,202	N.D.	N.D.	20,99

N.D.: no determinado. Los valores no pudieron ser determinados porque el número de datos en las gráficas de supervivencia era insuficiente.

Como se observa en la Figura 8A y Tabla 1, los esporos incubados a una a_w de 0,99 y 40 °C presentaron un menor valor $D_{100,0\text{ °C}}$ que el control, a causa de un ligero descenso de SI y un leve aumento de K_{max} . Por el contrario, los esporos almacenados a una a_w de 0,30 (40 °C) fueron más resistentes que el control debido a un aumento de la longitud del hombro, y a pesar de que K_{max} fuera superior. Las cinéticas de inactivación de las suspensiones almacenadas a 40 °C diferían exclusivamente en SI, siendo el doble en los esporos de a_w 0,30 con respecto a 0,99, manteniéndose K_{max} constante. A 102,5 °C y 105,0 °C, las gráficas de supervivencia de las muestras de a_w 0,99 (40 °C) y el control prácticamente se superponen (Figura 8B y 8C), mostrando parámetros de resistencia similares (Tabla 1). Sin embargo, los esporos almacenados a una a_w de 0,30 (40 °C) seguían siendo mucho más resistentes que el control y los incubados a

a_w 0,99 (40 °C), mostrando valores de $D_{102,5\text{ °C}}$ y $D_{105,0\text{ °C}}$ 1,4 veces superiores. Estas diferencias en termorresistencia se debían a la mayor longitud del hombro de los esporos en una a_w 0,30 (40 °C), y también a una ligera disminución en K_{\max} a 102,5 °C.

Los hombros de las gráficas de inactivación de los esporos se han atribuido a una mayor resistencia de las estructuras del espora al efecto del calor y/o a la actuación de los mecanismos de reparación, de forma que en las primeras fases del tratamiento térmico se acumulan daños subletales que pueden ser reparados cuando los esporos germinan en un medio de recuperación óptimo (Cebrián, Condón y Mañas, 2017). Esto explicaría por qué al aumentar la temperatura de tratamiento, la longitud de los hombros disminuye (Figura 8, Tabla 1), ya que las temperaturas más elevadas pueden provocar una mayor extensión o gravedad de los daños imposibilitando su recuperación. La otra causa que puede desencadenar los hombros es la presencia de esporos superlatentes que no pueden crecer en las condiciones óptimas de cultivo pero que, al ser expuestos a un tratamiento térmico subletal, pueden activar la germinación (Ghosh et al., 2009). Debido a que los recuentos microscópicos de las suspensiones coincidían con el recuento en placas, es decir apenas existían esporos superlatentes, nos inclinamos por la teoría de que los hombros de las curvas de supervivencia se relacionaban con el acúmulo de daños y la reparación. Por tanto, la mayor resistencia de los esporos adquirida durante la incubación en un medio de a_w 0,30 a 40 °C, cuyas curvas de supervivencia presentaban un mayor hombro con respecto a las muestras incubadas a una a_w de 0,99 a la misma temperatura y el control, podría deberse a que el calor produce menos daños en los esporos deshidratados. Se ha estimado que la a_w del interior de los esporos es de alrededor de 0,85 (Algie, 1984), por lo que la incubación en un medio con glicerol a a_w 0,30 podría provocar la salida progresiva del agua del núcleo protegiendo a sus estructuras, especialmente las proteínas, del efecto del calor.

A partir de los valores D_T estimados (Tabla 1), se realizó la gráfica de termodestrucción de los esporos control (a_w 0,99, 4 °C), los incubados a una a_w de 0,30 y a una a_w de 0,99 (40 °C) (Figura 8D), y se calcularon los correspondientes valores z . El valor z en las tres muestras fue muy parecido, siendo ligeramente superior en el caso de los esporos deshidratados a una a_w de 0,30 ($z = 9,52\text{ °C}$, $R^2 = 0,995$), seguido de los esporos incubados a una a_w de 0,99 a 40 °C ($z = 9,00\text{ °C}$, $R^2 = 0,981$) y los esporos control ($z = 8,81\text{ °C}$, $R^2 = 1,000$). El mayor valor z de los primeros indica que la deshidratación a una a_w de 0,30 a 40 °C de los esporos hace que los cambios de temperatura afecten menos a la termorresistencia de los esporos en comparación con los que se almacenan a una a_w de 0,99 entre 4 °C y 40 °C.

4.2 Resistencia al calor de los esporos deshidratados por métodos físicos

Para los métodos físicos, se probó a deshidratar los esporos por centrifugación a vacío y secado por aspersión en una solución de maltodextrina al 10 %. Por el método de centrifugación a vacío se redujo la a_w hasta 0,465 mientras que en el secado por aspersión la a_w fue de 0,275. Estas a_w son muy inferiores a la estimada del protoplasto de los esporos (a_w 0,85; Algie, 1984).

Una vez obtenidos los esporos deshidratados por ambos métodos, se determinó su cinética de inactivación en el termorresistómetro aplicando una temperatura de 100,0 °C, y se comparó con la inactivación de los esporos control, almacenados en agua destilada (a_w 0,99) a 4 °C. Las pruebas de termorresistencia se realizaron inmediatamente después de su deshidratación y tras un periodo de almacenamiento de 2 meses a temperatura ambiente (Figura 9). Las gráficas de supervivencia se ajustaron al modelo “log-lineal + shoulder” de Geeraerd, Herremans y Van Impe (2000). Los parámetros de resistencia estimados aparecen en la Tabla 2.

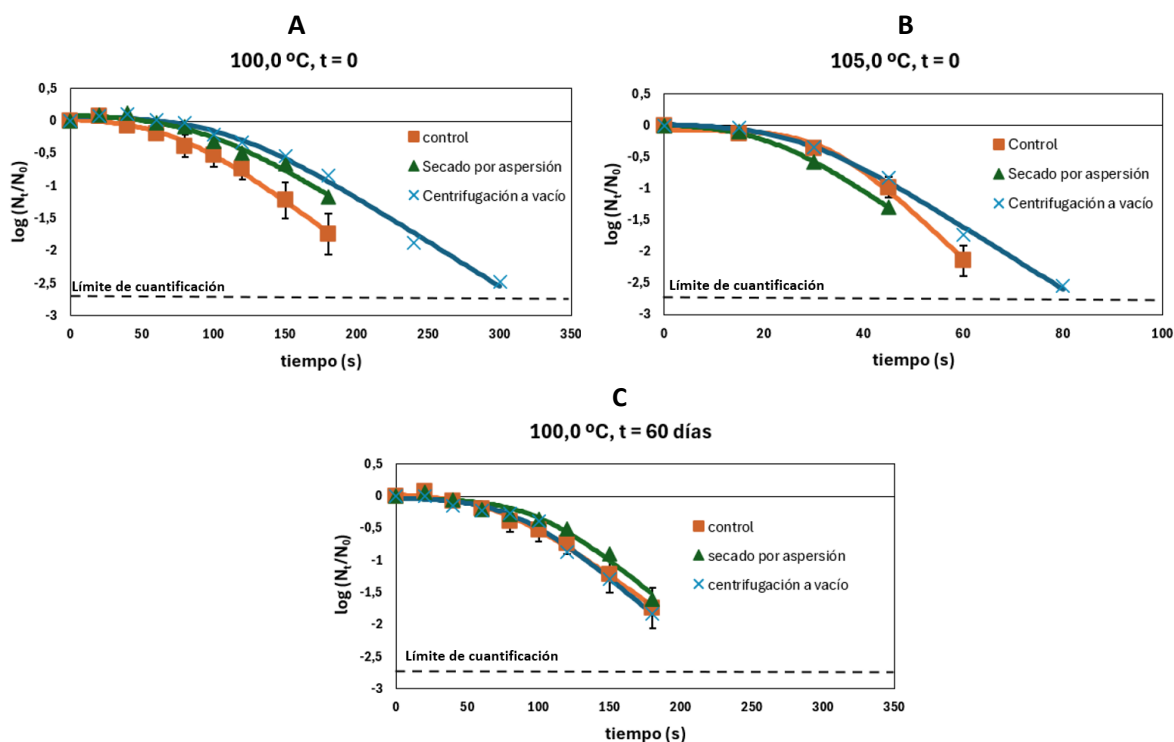


Figura 9. Gráficas de supervivencia a 100,0 °C (A y C) y 105,0 °C (B) de las suspensiones de esporos deshidratadas por secado por aspersión y por centrifugación a vacío y la suspensión control (a_w 0,99, 4 °C) a distintos tiempos de almacenamiento: A y B) Inmediatamente después del proceso de deshidratado (t = 0 días); C) Tras 2 meses a temperatura ambiente (t = 60 días). La línea punteada se corresponde con el límite de cuantificación (10 UFC/placa).

En la Figura 9A se observa que ambos tipos de deshidratado aumentaron de manera similar la termorresistencia de los esporos inmediatamente después del proceso, siendo ligeramente superior en el caso de los esporos deshidratados por centrifugación a vacío que por secado por

aspersión. La Tabla 2 muestra que este aumento de resistencia se debía al aumento del hombro, siendo el de las muestras sometidas a centrifugación a vacío el de mayor longitud, y a una ligera disminución de K_{max} . Como consecuencia, el valor $D_{100,0}^{\circ C}$ de los esporos deshidratados por centrifugación a vacío y secado por aspersión fue 1,4 y 1,2 veces superior, respectivamente, con respecto al control. Esto podría deberse a que la deshidratación produjo una disminución de agua en el núcleo de los esporos haciendo que fuera más resistente al calor y se pudiera recuperar en mayor parte frente a los daños producidos por el tratamiento.

Tabla 2. Parámetros de resistencia (SI y K_{max}), junto con los correspondientes valores de R^2 y RECM, obtenidos al ajustar las curvas de supervivencia de la Figura 9 al modelo de “log-lineal + shoulder” de Geeraerd, Herremans y Van Impe (2000) (Ec. [2]). Los valores D_T se estimaron a partir de la Ec. [3].

T (°C)	Tiempo de almacenamiento (días)	Suspensión	SI (s)	K_{max} (s ⁻¹)	R^2	RECM	D_T (s)
100,0	0	Secado por aspersión	92,29	0,032	0,973	0,081	165,32
		Centrifugación a vacío	110,27	0,032	0,992	0,083	182,63
		Control	73,82	0,037	0,994	0,053	135,26
100,0	60	Secado por aspersión	99,87	0,042	0,977	0,093	154,18
		Centrifugación a vacío	84,10	0,043	0,991	0,072	137,47
		Control	73,82	0,037	0,994	0,053	135,26
105,0	0	Secado por aspersión	21,68	0,128	0,999	0,027	39,68
		Centrifugación a vacío	27,55	0,115	0,996	0,087	47,59
		Control	32,44	0,170	0,994	0,092	45,97

También se evaluó la termorresistencia de las tres muestras a una temperatura más elevada (105,0 °C) para saber si se mantenían las diferencias (Figura 9B, Tabla 2). Al aumentar la temperatura de tratamiento, el valor $D_{105,0}^{\circ C}$ de la muestra deshidratada por centrifugación a vacío fue similar al control, mientras que el de la muestra secada por aspersión fue inferior debido a la reducción de SI. Estos resultados indican que la deshidratación no protegía a los esporos del calor a temperaturas superiores a 100,0 °C.

Tras dos meses de almacenamiento a temperatura ambiente, se volvió a evaluar la termorresistencia de los esporos deshidratados por centrifugación a vacío y secado por aspersión a 100,0 °C, temperatura a la cual se observaron las mayores diferencias. En la muestra deshidratada por centrifugación a vacío y almacenada durante 2 meses, el hombro se redujo y la K_{max} aumentó con respecto a las tratadas el día 0, de forma que el valor $D_{100,0}^{\circ C}$ se redujo 1,3 veces. De esta forma, el valor $D_{100,0}^{\circ C}$ de los esporos deshidratados por centrifugación a vacío

igualó al de los esporos control. Por otro lado, en los esporos secados por aspersión, la K_{max} de las gráficas de supervivencia aumentó con el tiempo de almacenamiento, manteniéndose la longitud del hombro similar al de la muestra inicial, resultando en un valor $D_{100,0\text{ }^{\circ}\text{C}}$ prácticamente igual al control. En definitiva, el incremento en termorresistencia observado inmediatamente tras aplicar los dos procesos de deshidratación física desaparecía con el tiempo de tratamiento.

Es importante destacar que durante este periodo la a_w de las muestras no aumentó más de 0,15, indicando que la pérdida en termorresistencia probablemente no se debía a su rehidratación. Por tanto, estos resultados indican que la deshidratación física, bien por centrifugación a vacío, bien por secado por aspersión, incrementa la termorresistencia de los esporos inmediatamente tras el proceso. Este aumento era superior al observado con el método osmótico, en el que no se vio variaciones de termorresistencia antes de los primeros 7 días de incubación en soluciones de glicerol con una a_w baja (0,30 - 0,50) a ninguna de las temperaturas de almacenamiento. Sin embargo, la termorresistencia en los esporos deshidratados de forma física desaparece con el tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente, mientras que en los deshidratados con glicerol fue aumentando hasta estabilizarse a los 13 días. El incremento en el valor $D_{100,0\text{ }^{\circ}\text{C}}$ por los métodos físicos tras su aplicación (entre 1,2 y 1,4 veces con respecto al control; Tabla 2) fue similar al de los deshidratados osmóticamente a una a_w de 0,30 y 40 °C a los 13 días de almacenamiento (1,2 veces con respecto al control; Tabla 1).

5 CONCLUSIONES

En este trabajo se han estudiado los efectos que tienen distintos métodos de deshidratación en la resistencia al calor húmedo de los esporos, obteniéndose las siguientes conclusiones:

- El deshidratado osmótico por adición de glicerol causó un aumento progresivo a lo largo del tiempo de almacenamiento de la resistencia térmica (100,0 °C) a a_w entre 0,80 y 0,30 y temperaturas entre 16 °C y 40 °C, de acuerdo al modelo de regresión múltiple generado. Este aumento de resistencia se estabilizó a partir de los 13 días de incubación. Las mayores variaciones de termorresistencia causadas por los cambios en la a_w se produjeron en los esporos almacenados a 40 °C, ya que la resistencia de los esporos suspendidos en las a_w más altas (aproximadamente > 0,75) disminuyó, mientras que la de los incubados a las a_w más bajas (aproximadamente < 0,75) aumentó.
- Los esporos deshidratados a una a_w de 0,30 y 40 °C durante 13 días presentaban un valor $D_{100,0\text{ }^{\circ}\text{C}}$ 1,2 veces mayor que el del control y unos valores $D_{102,5\text{ }^{\circ}\text{C}}$ y $D_{105,0\text{ }^{\circ}\text{C}}$ 1,4 veces superiores. Como consecuencia, el valor z de estos esporos resultó ligeramente superior al de los esporos control (9,52 °C vs. 8,81 °C).

- El deshidratado físico de los esporos, bien por centrifugación a vacío o por secado por aspersión, aumentó la resistencia al calor a 100,0 °C de los esporos inmediatamente después del proceso, teniendo un valor $D_{100,0\text{ °C}}$ 1,35 y 1,22 veces superior al control, respectivamente. Esto fue debido principalmente a un aumento del hombro y una ligera disminución del valor K_{\max} . Sin embargo, los esporos deshidratados no tenían ninguna ventaja a una temperatura de tratamiento superior de 105,0 °C, mostrando la misma resistencia que los esporos control.
- El almacenamiento de los esporos deshidratados por centrifugación a vacío o secado por aspersión a temperatura ambiente durante 2 meses causó la pérdida de termorresistencia debido principalmente a un aumento en el valor K_{\max} , de forma que los valores $D_{100,0\text{ °C}}$ disminuyeron hasta igualarse con los del control.
- Existen diferencias marcadas entre el efecto de la deshidratación osmótica y física en la termorresistencia de los esporos, indicando que estos producen cambios distintos en las estructuras celulares. Mientras que la deshidratación osmótica aumentaba la resistencia al calor de los esporos a lo largo del tiempo de incubación en medios de a_w baja y temperaturas moderadas, los esporos deshidratados por los métodos físicos solo presentaban mayor termorresistencia inmediatamente tras aplicar el proceso. Sin embargo, el incremento máximo a 100,0 °C fue similar en todos los procesos (entre 1,2 y 1,4 veces superior al control). Además, los esporos deshidratados osmóticamente presentaban mayor resistencia en todo el rango de temperaturas estudiado (100,0 °C - 105,0 °C), mientras que los deshidratados solo presentaban ventajas a una temperatura de tratamiento de 100,0 °C.
- Finalmente, los aumentos en la termorresistencia a 100,0 °C de los esporos deshidratados por métodos químicos y físicos observados en este trabajo no explican la elevada resistencia de los esporos de esta misma cepa que contaminan los productos deshidratados (entre 5 y 10 veces superior a la de los esporos cultivados en el laboratorio e inoculados en el mismo producto; datos proporcionados por el CNTA).

CONCLUSIONS

In this work, the effects of different dehydration methods on the resistance to moist heat of spores have been studied, obtaining the following conclusions:

- Osmotic dehydration by addition of glycerol caused a progressive increase with the storage time of the thermal resistance (100,0 °C) at a_w between 0,80 and 0,30 and temperatures between 16 °C and 40 °C, according to the generated multiple regression model. This increase in resistance stabilized after 13 days of incubation. The greatest variations in thermoresistance caused by changes in a_w occurred in spores stored at 40 °C, since the

resistance of spores suspended at the highest a_w (approximately $> 0,75$) decreased, while that of incubated at the lowest a_w (approximately $< 0,75$) increased.

- The spores dehydrated at a_w of 0,30 and 40 °C for 13 days had a $D_{100,0^\circ\text{C}}$ value 1,2 times higher than that of the control and values $D_{102,5^\circ\text{C}}$ and $D_{105,0^\circ\text{C}}$ 1,4 times higher. Consequently, the z value of these spores was slightly higher than that of the control spores (9,52 °C vs. 8,81 °C).
- Physical dehydration of the spores, either by vacuum centrifugation or by spray drying, increased the heat resistance at 100,0 °C of the spores immediately after the process, with a $D_{100,0^\circ\text{C}}$ value of 1,35 and 1,22 times higher than the control, respectively. This was mainly due to an increase in the shoulder and a slight decrease in the K_{max} value. However, dehydrated spores had no advantage at a higher treatment temperature of 105,0 °C, showing the same resistance as control spores.
- Storage of the dehydrated spores by vacuum centrifugation or spray drying at room temperature for 2 months caused the loss of thermoresistance due mainly to an increase in the K_{max} value, so that the $D_{100,0^\circ\text{C}}$ values decreased until they were equal to the of control.
- There are marked differences between the effect of osmotic and physical dehydration on the resistance of spores to heat, indicating that these produce different changes in cellular structures. While osmotic dehydration increases the spore thermoresistance with the incubation time in low a_w media and moderate temperatures, spores dehydrated by physical methods only presented greater thermoresistance immediately after applying the process. However, the maximum increase in thermoresistance at 100,0 °C was similar in all processes (between 1,2 and 1,4 times higher than the control). Furthermore, osmotically dehydrated spores had greater resistance in the temperature range studied (100,0 °C - 105,0 °C), while the dehydrated ones only had advantages at a treatment temperature of 100,0 °C.
- Finally, the increases in thermoresistance at 100,0 °C of spores dehydrated by chemical and physical methods observed in this work (between 1,2 and 1,4 times) do not explain the high resistance of the spores of this same strain that contaminate dehydrated products (between 5 and 10 times higher than that of spores grown in the laboratory and inoculated in the same product; data provided by the CNTA).

6 VALORACIÓN PERSONAL

Realizar este Trabajo de Fin de Grado me ha permitido aplicar una gran cantidad de conocimientos que había ido desarrollando a lo largo de la carrera, así como adquirir la capacidad de planificar y organizar mi tiempo para poder realizar los experimentos requeridos. A partir de estos experimentos he aprendido a trabajar de forma autónoma en un laboratorio y

a tomar decisiones a partir de los resultados obtenidos. Además, este trabajo me ha dado la oportunidad de ampliar mis conocimientos en microbiología y profundizar en los diferentes métodos de deshidratación de alimentos.

Me gustaría agradecer a Santiago y Elisa por haberme propuesto este tema de trabajo y ayudado en la toma de decisiones y en mi desempeño en el laboratorio, así como a la Facultad de Veterinaria, por darme la oportunidad de asistir al IV Congreso Nacional CyTA Junior celebrado en la Universidad de Barcelona para presentar mi trabajo como comunicación oral. Agradecer especialmente a Elisa por todo el apoyo que me ha ofrecido estas últimas semanas y a los becarios del departamento por su ayuda en el laboratorio. Por último, quiero agradecer a mis amigos y a mi familia, en especial a mi madre, por haberme apoyado en todo momento.

7 REFERENCIAS

- Algie, J.E. (1984). "Effect of the internal water activity of bacterial spores on their heat resistance in water". *Curr. Microbiol.*, 11, pp. 293–295
- Alvarenga, V.O. et al. (2018a). "Quantifying the Responses of Three *Bacillus cereus* Strains in Isothermal Conditions and During Spray Drying of Different Carrier Agents". *Front. Microbiol.*, 9, 1113.
- Alvarenga, V.O. et al. (2018b). "Survival variability of 12 strains of *Bacillus cereus* yielded to spray drying of whole milk". *Int. J. Food Microbiol.*, 286, pp. 80-89.
- Beaman, T.C., Gerhardt, P. (1986). "Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization, and thermal adaptation". *Appl. Environ. Microbiol.* 52, pp. 1242-1246.
- Berendsen, E.M. et al. (2015). "Two distinct groups within the *Bacillus subtilis* group display significantly different spore heat resistance properties". *Food Microbiol.*, 45, Part A, pp.18-25.
- Berendsen, E.M. et al. (2016). "A mobile genetic element profoundly increases heat resistance of bacterial spores". *ISME J*, 10(11), pp. 2633–2642.
- Bigelow, W. D. (1921). "The logarithmic nature of thermal death time curves". *J. Infect. Dis.*, 29(5), pp. 528–536.
- Bressuire-Isoard, C., Broussolle, V., Carlin, F. (2018). "Sporulation environment influences spore properties in *Bacillus*: evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms". *FEMS Microbiol. Rev.*, 42(5), pp. 614-626.
- Cebrián, G., Condón, S., Mañas, P. (2017). "Physiology of the Inactivation of Vegetative Bacteria by Thermal Treatments: Mode of Action, Influence of Environmental Factors and Inactivation Kinetics". *Foods*, 6(12), 107.

- Ciurzyńska, A., Lenart, A. (2011). "Freeze-Drying - Application in Food Processing and Biotechnology - a Review". *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 61(3), pp. 165-171.
- Colas de la Noue et al. (2020). "The molecular dynamics of bacterial spore and the role of calcium dipicolinate in core properties at the sub-nanosecond time-scale". *Sci. Rep.*, 10, 8265.
- Coleman, W.H. et al. (2010). "Mechanism of killing of spores of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium* by wet heat". *Lett. Appl. Microbiol.*, 50, pp. 507-514.
- Coroller, L., Leguérinel, I., Mafart, P. (2001). "Effect of Water Activities of Heating and Recovery Media on Apparent Heat Resistance of *Bacillus cereus* Spores". *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, pp. 317–322.
- den Besten, H.M.W., Wells-Bennik, M.H.J., Zwietering, M.H. (2018). "Natural Diversity in Heat Resistance of Bacteria and Bacterial Spores: Impact on Food Safety and Quality". *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 9, pp. 383–410.
- Eijlander, R., Kyrlyenko, A., Wells-Bennik, M. (2023). "Bacterial spores in plant-based ingredients: implications for the food industry", *10th European Spore Conference*. Cambridge, UK, 3-5 abril 2023.
- Esty, J. R., Meyer, K. F. (1922). "The heat resistance of the spores of *B. botulinus* and allied anaerobes. XI". *J. Infect. Dis.*, 31(6), pp. 650-663.
- Fine, F., Gervais, P. (2005). "A new high temperature short time process for microbial decontamination of seeds and food powders". *Powder Technol.*, 157, pp. 108-113.
- Freire, V. et al. (2023). "Comparative study on the impact of equally stressful environmental sporulation conditions on thermal inactivation kinetics of *B. subtilis* spores". *Int. J. Food Microbiol.*, 405, 110349.
- Freire, V., Condón, S., Gayán, E. (2024). "Impact of sporulation temperature on germination of *Bacillus subtilis* spores under optimal and adverse environmental conditions". *Food Res. Int.*, 182, 114064.
- Geeraerd, A.H., Herremans, C., Van Impe, J. (2000). "Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment". *Int. J. Food Microbiol.* 59, 185–209.
- Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P., Van Impe, J. (2005). "GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves". *Int. J. Food Microbiol.*, 102(1), pp. 95-105.
- Ghosh, S. et al. (2009). "Superdormant Spores of *Bacillus* Species Have Elevated Wet-Heat Resistance and Temperature Requirements for Heat Activation". *J. Bacteriol.*, 191(18), pp. 5584–91.
- Huang, Y., Flint, S. H., Palmer, J. S. (2021). "The heat resistance of spores from biofilms of *Bacillus cereus* grown in tryptic soy broth and milk". *Int. Dairy J.*, 123, 105169.

- Inyang, U., Innocent, O., Etuk, B.R. (2017). "Drying and the Different Techniques". *Int. J. Food Nutr. Saf.* 8(1), pp. 45-72.
- Kanaan, J. et al. (2022). "Resistance properties and the role of the inner membrane and coat of *Bacillus subtilis* spores with extreme wet heat resistance" *J. Appl. Microbiol* 132, pp. 2157-2166
- Kihm, D.J. et al. (1990). "Influence of transition metals added during sporulation on heat resistance of *Clostridium botulinum* 113B spores". *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(3), pp. 681-5.
- Knudsen, S.M. et al. (2016). "Water and Small-Molecule Permeation of Dormant *Bacillus subtilis* Spores". *J. Bacteriol.*, 198 (1), pp- 168 – 177.
- Koopman, N. et al. (2022). "Mechanisms and Applications of Bacterial Sporulation and Germination in the Intestine". *Int. J. Mol. Sci.*, 23(6), 3405.
- Korza, G. et al (2023). Expression of the 2Duf protein in wildtype *Bacillus subtilis* spores stabilizes inner membrane proteins and increases spore resistance to heat and hydrogen peroxide. *J. Appl. Microbiol.*, 134(3), lxad040.
- Liang, R. et al. (2019). "Aspartic acid racemization constrains long-term viability and longevity of endospores". *FEMS Microbiol. Ecol.*, 95: fiz132.
- Luangthongkam, P. et al. (2021). "Comparison of spray-drying and freeze-drying for inoculum production of the probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* strain H57". *Food Bioprod. Process.*, 130, pp. 121-131.
- Melly E. et al. (2002). "Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures". *J. Appl. Microbiol.* 92(6), pp. 1105-1115.
- Moir A. (1981) "Germination properties of a spore coat-defective mutant of *Bacillus subtilis*". *J. Bacteriol.*, 146(3), pp.1106-16.
- Murrell, W.G., Scott, W. J. (1966). "The Heat Resistance of Bacterial Spores at Various Water Activities". *J. gen. Microbiol.*, 43, pp. 411-425.
- Nowak, D., Jakubczyk, E. (2020). "The Freeze-Drying of Foods-The Characteristic of the Process Course and the Effect of Its Parameters on the Physical Properties of Food Materials". *Foods* 9(10), 1488.
- Odlaug, T.E, Caputo, R.A, Graham, G.S. (1981). "Heat Resistance and Population Stability of Lyophilized *Bacillus subtilis* Spores". *Appl. Environ. Microbiol.*, 41(6), pp. 1374-7.
- Paidhungat M., Setlow P. (2000). "Role of Ger proteins in nutrient and non-nutrient triggering of spore germination in *Bacillus subtilis*". *J. Bacteriol.* 182, pp. 2513–2519.
- Palop, A., Mañas, P., Condón, S. (1999). "Sporulation Temperature and heat resistance of *Bacillus* spores: a review". *J. Food Saf.*, 19, pp. 57-72.

- Ruiz, V. et al. (2021). "Impact of shoulders on the calculus of heat sterilization treatments with different bacterial spores". *Food Microbiol.*, 94, 103663.
- Sadiq, F.A. et al. (2017). "Propensity for biofilm formation by aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders". *Int. J. Food Microbiol.*, 262, pp. 89-98.
- Sadiq, F.A., Flint, S., He, Q-q. (2018). "Microbiota of milk powders and the heat resistance and spoilage potential of aerobic spore-forming bacteria". *Int. Dairy J.*, 85, pp. 159-168.
- Sala, F.J. et al. (1995). "Sporulation Temperature and Heat Resistance of *Bacillus subtilis* at Different pH Values". *J. Food Prot.*, 58(3), pp. 239-243.
- Sapru, V., Labuza, T.P. (1993). "Glassy state in bacterial spores predicted by polymer glass-transition theory". *J. Food Sci.*, 58, pp. 445-448.
- Scheldeman, P. et al. (2006). "*Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk". *J. Appl. Microbiol.*, 101, pp. 542-555.
- Scott, S.A. et al. (2007). "The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder". *Int. J. Dairy Technol.*, 60, pp. 109-117.
- Setlow, P. (2006). "Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals". *J. Appl. Microbiol.*, 101(3), pp. 514-525.
- Setlow P., Christie, G. (2023). "New Thoughts on an Old Topic: Secrets of Bacterial Spore Resistance Slowly Being Revealed". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 87(2), e00080.
- Singh, S., Dixit, D. (2014). "A review on spray drying: emerging technology in food industry". *International Journal of Applied Engineering and Technology*, 4(1), pp. 1-8.
- Sunde, E.P. et al. (2009). "The physical state of water in bacterial spores". *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106 (46), pp. 19334-19339.
- Tiburski, J.H. et al. (2014). "Water Distribution in Bacterial Spores: A Key Factor in Heat Resistance". *Food Biophys.*, 9, pp. 10-19.
- Wells-Bennik, M.H. et al (2016). "Bacterial Spores in Food: Survival, Emergence, and Outgrowth". *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 7, pp. 457-82.
- Wells-Bennik, M.H. et al. (2019) "Heat resistance of spores of 18 strains of *Geobacillus stearothermophilus* and impact of culturing conditions". *Int J Food Microbiol*, 291, pp.161-172.
- Yadav, A.K., Singh, S.V. (2014). "Osmotic dehydration of fruits and vegetables: a review". *J. Food Sci. Technol.*, 51(9), pp. 1654-73.
- Zhou, X. et al. (2008). "Activity-loss characteristics of spores of *Bacillus thuringiensis* during spray drying". *Food Bioprod. Process.*, 86(1), pp.37-42.