



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

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

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

Autor/es

Jorge Bellón García

Director/es

Elisa Gayán y Paula Gómara

Facultad de Veterinaria de Zaragoza

2024

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Importancia de las bacterias formadoras de esporos dentro de la industria alimentaria	4
1.2. Especies bacterianas formadoras de esporos	6
1.3. Formación y estructura del espora	7
1.4. Germinación	9
1.4.1. Activación	10
1.4.2. Fase I germinación	10
1.4.3. Fase II germinación	11
1.4.4. "Outgrowth"	11
1.4.5. Agentes no nutritivos inductores de la germinación	11
1.5. Heterogeneidad en la germinación	12
1.6. Estudio de la fisiología de los esporos bacterianos mediante mutantes " <i>knock-out</i> "	14
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	15
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
3.1. Microorganismos y cultivo.....	16
3.2. Esporulación	16
3.3. Cinética de germinación	17
3.3.1. Cinética de germinación mediante espectrofotometría	17
3.3.2. Cinética de germinación mediante recuento en placa	18
3.4. Modelización matemática	18
3.5. Análisis estadístico	19
3.6. Verificación de la ausencia del gen en los mutantes seleccionados.....	19
4.RESULTADOS	20
4.1. Cribado de mutantes	20
4.2. Optimización de la cinética de germinación mediante recuento en placa	23
4.3. Confirmación de los cambios en la cinética de germinación de los mutantes seleccionados mediante recuento en placa.....	24
4.4. Identificación de la función de los genes eliminados en los mutantes seleccionados.....	27
4.5. Confirmación de la delección del gen diana en los mutantes seleccionados	29
5. CONCLUSIÓN	31
5. CONCLUSION	32
6. VALORACIÓN PERSONAL	33
7. BIBLIOGRAFÍA	33
8. ANEXOS	38

RESUMEN

La producción de alimentos seguros y estables, y que a su vez conserven lo máximo posible sus atributos sensoriales y nutricionales, supone un gran reto para la industria alimentaria, en parte por la contaminación de las materias primas con esporos bacterianos. Los esporos son extremadamente resistentes, de forma que para su inactivación se aplican tratamientos térmicos de alta intensidad que frecuentemente deterioran la calidad del producto. Unas de las alternativas más atractivas al calor son los tratamientos de germinación-inactivación, que consisten en inducir la germinación para luego inactivar las células germinadas más sensibles con tratamientos de intensidad moderada. Para diseñar procesos eficientes, es necesario conocer en profundidad a nivel celular y molecular el proceso de germinación.

El objetivo de este trabajo es identificar nuevos genes relacionados con la germinación de los esporos de *B. subtilis* utilizando una colección de mutantes “*knock-out*”. Se realizó el cribado de 119 mutantes que presentaban diferencias estadísticamente significativas en los parámetros cinéticos de germinación (longitud del hombro, velocidad de germinación y/o la eficiencia de germinación al final del ensayo) con respecto a la cepa parental determinados mediante espectrofotometría. Posteriormente, se confirmaron las diferencias de comportamiento entre los mutantes y la cepa parental evaluando la cinética de germinación mediante recuento en placa. Finalmente, se relacionó la función de cada gen mutado con los cambios en la germinación.

La delección de los genes *spoVT* (que codifica un regulador transcripcional involucrado en la esporulación) o *gerD* (que codifica una proteína que transduce la señal del inicio de la germinación) empeoró la respuesta de los esporos a nutrientes, como se ha demostrado anteriormente. Además, los esporos carentes de *spoVT* respondían deficientemente al CaDPA. Por otro lado, identificamos y confirmamos la influencia de nuevos genes que hasta ahora no se habían relacionado con la germinación: *yslH*, *ydeG*, y *ydaJ*.

ABSTRACT

The production of safe and stable foods, which also preserve their sensory and nutritional attributes as much as possible, poses a significant challenge for the food industry, partly due to the contamination of raw materials with bacterial spores. Spores are extremely resistant, so high-intensity thermal treatments are applied for their inactivation, which often deteriorates the product's quality. One of the most attractive alternatives to heat is germination-inactivation treatments, which involve inducing germination and then inactivating the more sensitive germinated cells with moderate-

intensity treatments. To design efficient processes, it is necessary to have an in-depth understanding of the germination process at the cellular and molecular levels.

The objective of this work is to identify new genes related to the germination of *B. subtilis* spores using a collection of “knock-out” mutants. Screening was performed on 119 mutants that showed statistically significant differences in germination kinetic parameters (shoulder length, germination rate, and/or germination efficiency at the end of the assay) compared to the parent strain, determined by spectrophotometry. Subsequently, the behavioral differences between the mutants and the parent strain were confirmed by evaluating the germination kinetics using plate counts. Finally, the function of each mutated gene was related to changes in germination.

The deletion of the *spoVT* gene (which encodes a transcriptional regulator involved in sporulation) or the *gerD* gene (which encodes a protein that transduces the germination initiation signal) worsened the response of the spores to nutrients, as previously demonstrated. Additionally, spores lacking *spoVT* responded poorly to CaDPA. On the other hand, we identified and confirmed the influence of new genes that had not previously been related to germination: *yxjH*, *ydeG*, and *ydaJ*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia de las bacterias formadoras de esporos dentro de la industria alimentaria

La producción de alimentos microbiológicamente seguros y de alta calidad requiere el control de muchos factores, incluida la calidad de las materias primas, las condiciones de procesamiento de los alimentos, la higiene, las condiciones adecuadas de almacenamiento y la estabilidad microbiana de los alimentos. Este último factor puede lograrse mediante la inactivación o eliminación de microorganismos indeseables, la prevención del crecimiento microbiano y evitando la recontaminación de los alimentos (Besten, Wells-Bennik y Zwietering, 2018).

Uno de los microorganismos cuyo control supone un gran desafío para la industria alimentaria son las bacterias formadoras de esporos. Los esporos bacterianos son formas de resistencia que algunos géneros, como *Bacillus* y *Clostridium*, originan ante condiciones ambientales adversas, especialmente la falta de nutrientes (Setlow, Wang y Li, 2017) (Gauvry et al, 2017). Las células vegetativas inician un proceso de división asimétrica que da lugar a una endospora, metabólicamente inactiva, que puede permanecer durante periodos indefinidos en estado de latencia.

Los esporos son resistentes a numerosas condiciones ambientales, incluido el calor, la salinidad, la acidez, la radiación, el agotamiento del oxígeno y baja disponibilidad de nutrientes. Se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente, por lo que su entrada a la cadena

alimentaria es relativamente fácil. Además, cuando detectan cambios en su entorno (como la disponibilidad de nutrientes sobre un alimento), pueden desencadenar el proceso de germinación. Una vez iniciado este proceso, los esporos pueden volver a su forma celular vegetativa y retomar su división celular durante el almacenamiento de los alimentos, lo que puede derivar en alteraciones alimentarias, pérdidas económicas, e incluso toxiinfecciones alimentarias en el caso de cepas patógenas.

Las industrias emplean generalmente aplican un tratamiento térmico de alta intensidad (esterilización) para lograr la inactivación de los microorganismos esporulados. La eficiencia de este tratamiento dependerá de la temperatura, del tiempo, de la resistencia al calor del microorganismo esporulado, de las propiedades físicas del producto y de la forma en la que se le aporta el calor al alimento. La intensidad de los tratamientos térmicos destinados a la inactivación de los microorganismos esporulados supera considerablemente al aplicado en los tratamientos de pasteurización, cuyo objetivo es la eliminación de los microorganismos patógenos, principalmente en estado vegetativo (Wells-Bennik et al, 2016).

Sin embargo, los tratamientos térmicos de esterilización afectan negativamente a las cualidades organolépticas del alimento, alterando la calidad del sabor, el color y la textura debido a la desnaturalización de las proteínas, y a la descomposición de los nutrientes. Por este motivo, se han estudiado métodos no térmicos basados en la inactivación con altas presiones, ultrasonidos, ultravioleta, campos eléctricos de alto voltaje y plasma frío, así como esporicidas químicos (glutaraldehído, agentes liberadores de cloro, peróxidos y óxidos de etileno). Además, el uso combinado de tratamientos físicos anteriormente mencionados y los agentes antimicrobianos naturales como los aceites esenciales pueden actuar de forma sinérgica y eficaz para eliminar los esporos en la industria alimentaria (Cho y Chung, 2020). Los tratamiento actuales no son suficientemente efectivos para inactivar esporos a niveles que garanticen la seguridad y estabilidad de los alimentos. Se están estudiando alternativas como los tratamientos de germinación-inactivación. El tratamiento térmico subletal puede activar esporos latentes, convirtiéndolos en células vegetativas más susceptibles al calor. Así, se propone un doble tratamiento térmico: activación térmica de esporos, seguida de germinación e inactivación térmica, para controlar los esporos en alimentos (Løvndal et al, 2011). Kwon et al, estudiaron la inactivación de esporos de *B. cereus* mediante microondas y luz ultravioleta (Kwon et al, 2022). También se ha descrito la aplicación del proceso de tindalización para la inducción de la germinación de los esporos y, en combinación con un tratamiento térmico, la consiguiente inactivación térmica (Keratimanoch et al, 2021). Por otro lado, se han estudiado tecnologías de procesamiento no térmico, como el ozono acuoso y el procesamiento de alta

presión para inactivar esporos de *B. cereus* en aislados mesófilos y psicrotolerantes (Markland et al, 2013).

1.2. Especies bacterianas formadoras de esporos

Entre las bacterias que tienen la capacidad de formar esporos, cabe destacar el género *Clostridium*, *Bacillus*, *Geobacillus*, *Alicyclobacillus* y *Paenibacillus* como agentes frecuentemente implicados en la pérdida de estabilidad e intoxicaciones alimentarias.

Las especies del género *Clostridium* más comúnmente involucradas en enfermedades transmitidas por alimentos son *Clostridium perfringens* y *Clostridium botulinum*. La intoxicación por *C. perfringens* suele ser breve autolimitada y rara vez mortal. Sin embargo, las neurotoxinas de *C. botulinum* se encuentran entre las sustancias naturales más tóxicas y causan toxiinfecciones alimentarias, con síntomas que continúan durante varios meses, e incluso en algunos casos son mortales. Hay que tener en cuenta que el consumo de productos contaminados con esporos de *C. botulinum* no causa botulismo, sino que la germinación y multiplicación de *C. botulinum* acompañada de la producción de neurotoxinas deben ocurrir antes de consumir el alimento. *C. botulinum* es capaz de multiplicarse en una gama muy amplia de alimentos de pH superior a 4,5 desde temperatura ambiente y en refrigeración. Las cepas de *C. botulinum* se dividen en cuatro grupos (Grupo I-IV) en función de sus diferencias fisiológicas y la secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S. Los esporos de *C. botulinum* del Grupo I (proteolítico) son los más resistentes al calor y crecen a temperaturas de misofilia. Los esporos de *C. botulinum* del Grupo II (no proteolítico) son menos resistentes al calor, se inactivan calentándolas a 90 °C durante 10 minutos o mediante procesos equivalentes. Además, son psicrotrofas, siendo un problema en los productos refrigerados mínimamente procesados. Por otro lado, muchas especies de *Clostridium* pueden producir alteraciones organolépticas en los alimentos por la secreción de enzimas o metabolitos, la producción de gas que provoca el abombamiento de latas de conservas o la aparición de manchas blancas en el alimentos (EFSA, 2005).

El grupo de *B. cereus* incluye a una gran variedad de especies y cepas de bacterias anaerobias facultativas, que se dividen en siete grupos filogenéticos (I-VII) capaces de crecer a diferentes temperaturas (mesófilas, psicrotrofas y termófilas) (Webb et al, 2019). Además, algunas cepas producen toxinas, pudiendo desencadenar dos tipos de intoxicaciones alimentarias: el síndrome diarreico, que se manifiesta con diarrea y se ha relacionado con diferentes enterotoxinas producidas tras la germinación de los esporos y multiplicación en el sistema gastrointestinal, y el síndrome emético, que es el resultado de una intoxicación causada por una toxina que se preforma en los

alimentos (Ehling-Schulz, Lereclus y Koehler, 2019). Actualmente, las cepas de *B. cereus* pertenecientes al Grupo III y IV son las de mayor relevancia, ya que son las más virulentas y pueden crecer en diversos ambientes, siendo frecuentes en alimentos listos para el consumo que han sufrido temperaturas de almacenamiento abusivas (Antequera-Gómez et al, 2021).

Uno de los microorganismos esporulados alterantes más relevantes es *Geobacillus stearothermophilus*, siendo uno de los principales contaminantes de los productos alimenticios tratados por esterilización debido a que sus esporos son extremadamente resistentes al calor. Sin embargo, los esporos supervivientes germinan y crecen a temperaturas a partir de 45 °C. Sin embargo, el aumento de la temperatura previsto por el cambio climático, se espera que aumente los casos de pérdida de esterilidad durante la distribución y el transporte causados por este microorganismo (Misiou, Koutsoumanis y Membré, 2023).

1.3. Formación y estructura del espora

Como se ha mencionado anteriormente, ante condiciones ambientales adversas y falta nutritiva, las bacterias formadoras de esporos producen un tipo de célula latente metabólicamente inactiva llamada espora o endospora que es capaz de sobrevivir en condiciones ambientales adversas.

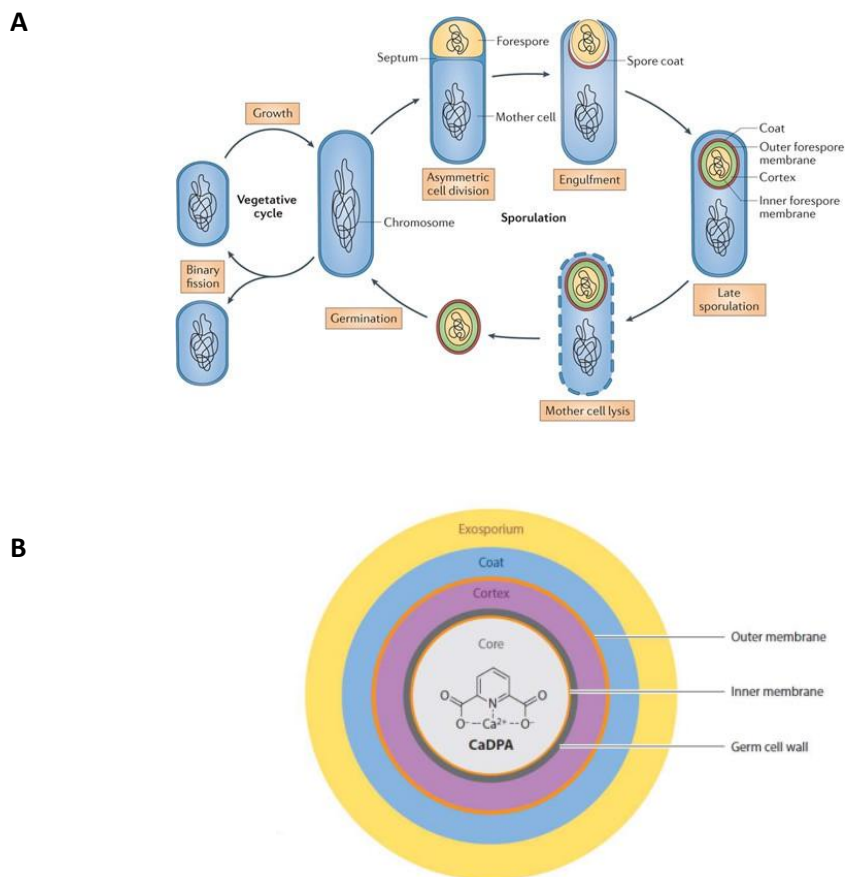


Figura 1: Esquema del proceso de esporulación (A) y la estructura del esporo bacteriano (B). Imágenes tomadas de McKenney, Driks y Eichenberger (2013) y Setlow, Wang y Li (2017), respectivamente.

Esta señal desencadena una división asimétrica del esporangio que resulta en la compartimentalización del material genético (figura 1A). Se forma un septo que separa la célula madre del preesporo, y la célula madre envuelve al preesporo originándose las distintas cubiertas que conforman el esporo. Finalmente, la célula madre se lisa, liberando un esporo maduro al medio ambiente. Los esporos pueden germinar rápidamente en respuesta a los nutrientes (McKenney, Driks y Eichenberger, 2013).

Como consecuencia de este proceso, la estructura tan peculiar de los esporos resultantes es lo que les proporciona una resistencia extrema en comparación con las células vegetativa y el mantenimiento de su estado de latencia. Comenzando desde el exterior y avanzando hacia el interior (Figura 1B), las capas del esporo incluyen el exosporio, la cubierta o “coat”, membrana externa, córtex, pared celular, la membrana interna y el núcleo central.

El exosporio es la capa más externa que se encuentra mayormente en algunas especies del grupo *B. cereus*, compuesta por proteínas y glicoproteínas propias de esta cubierta. A continuación, se encuentra el “coat” compuesta de varias capas proteicas que proporcionan resistencia a sustancias químicas y enzimas líticas exógenas que pueden degradar la corteza de los esporos.

La función de la membrana externa situada bajo el “coat” no está clara; aunque esta membrana es una estructura esencial en la formación de esporos, no parece ser una barrera de permeabilidad a sustancias químicas ni tener un efecto notable en la resistencia al calor de los esporos.

El córtex está compuesto de peptidoglicano (PG) con una estructura similar a la del PG de las células vegetativas, pero con varias modificaciones específicas de los esporos. Es esencial en los esporos latentes, participa en la reducción del contenido de agua del núcleo de los esporos pero se degrada durante la germinación, permitiendo la expansión e hidratación del núcleo. Bajo el córtex se encuentra la pared celular. Esta capa está también compuesta por PG con una estructura idéntica a la de las células vegetativas y se convierte en la pared celular de las células vegetativas germinadas.

A diferencia de la membrana externa, la membrana interna de los esporos es una fuerte barrera de permeabilidad que desempeña un papel importante en la resistencia de los esporos a muchas sustancias químicas. Aparece comprimida en el esporo latente y su volumen aumenta durante la primera fase de la germinación. Las moléculas de lípidos en la membrana interna son en gran

medida inmóviles, sin embargo, no difiere en composición lipídica con respecto a la membrana plasmática de las células en crecimiento.

En el interior del espora se encuentra el núcleo o protoplasto, que contiene la mayoría de las enzimas de los esporos, así como el ADN, ARN y ribosomas. El núcleo se caracteriza por su bajo contenido en agua y su gran contenido en ácido piridina-2,6-dicarboxílico (ácido dipicolínico, DPA), siendo ambos factores imprescindibles para el mantenimiento de la latencia enzimática de los esporos y la resistencia de los esporos a agentes físicos, como el calor. Mientras que el agua constituye del 75% al 80% del peso húmedo del núcleo de una célula vegetativa, solamente representa del 27% al 55 % del peso húmedo del núcleo de los esporos, dependiendo de la especie (Gerhardt y Marquis 1989). El DPA comprende del 5 al 15% del peso seco de los esporos de las especies *Bacillus* y *Clostridium* y se encuentra sólo en el núcleo, donde muy probablemente está quelado con cationes divalente, principalmente Ca^{+2} (Gerhardt y Marquis 1989). El DPA se sintetiza únicamente en el compartimento de la célula madre, se adsorbe en el espora y posteriormente se excreta en los primeros minutos de la germinación del espora. La cantidad de DPA en el núcleo está muy por encima de su solubilidad, y por tanto es en parte responsable de la reducción en el contenido de agua del núcleo durante la esporulación (Setlow, 2006).

1.4. Germinación

Cuando los esporos detectan que las condiciones ambientales vuelven a ser favorables para el crecimiento, el espora germina y crece hasta llegar a ser nuevamente una célula vegetativa. Entendemos por germinación el periodo que comienza con la adición de un compuesto desencadenante de la germinación, y continua con una serie de reacciones irreversibles, como la hidratación del protoplasto o la pérdida de resistencia a diferentes agentes físicos y químicos.

En la naturaleza, probablemente los esporos desencadenen la germinación en respuesta a los nutrientes o germinantes nutritivos. Estos germinantes son generalmente aminoácidos individuales, azúcares o nucleósidos de purina, minerales o sus combinaciones, como la mezcla de asparagina, glucosa, fructosa y potasio (AGFK) que desencadena la germinación de los esporos de *B. subtilis* (Setlow, 2003). Los esporos cuentan con diferentes receptores de germinación, cada uno de ellos específico para uno o varios germinantes. Todos los receptores de la germinación se forman en la fase final de la esporulación y se ubican en la membrana interna del espora. En *B. subtilis*, estos receptores están codificados por los operones *gerA*, *gerB* y *gerK*, cuya ausencia bloquea el inicio de la germinación, la liberación del DPA y la entrada del agua (Setlow, 2003). El operón *gerA* se ha identificado como el responsable de la germinación inducida por L-alanina, ya que, en ausencia de

alguno de sus tres genes, se reduce la germinación con este aminoácido (Paredes-Sabja, Setlow y Sarker, 2011). En el caso de los operones *gerB* y *gerK*, a pesar de tener una secuencia similar al operón *gerA*, son los responsables de la germinación inducida por AGFK (Sonenshein, Hoch y Losick, 2001).

De forma general, el proceso de germinación se divide en tres etapas: activación, fase I y fase II. Tras la germinación tiene lugar la fase de “outgrowth” o fase de desarrollo (Figura 2).

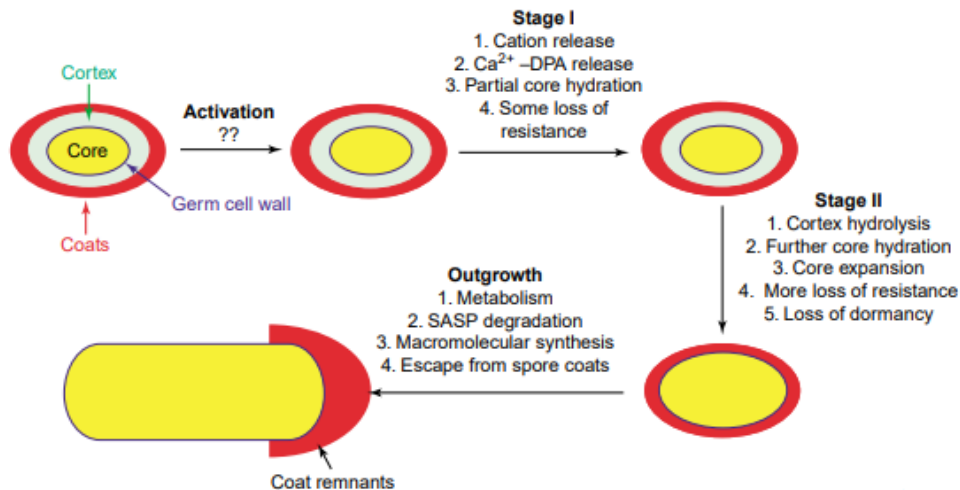


Figura 2: Eventos producidos en la germinación y desarrollo de los esporos. Figura tomada de Setlow (2003).

1.4.1. Activación

Para que los esporos inicien la germinación es necesario que primero sean activados. En la actualidad no se sabe realmente qué cambios se producen durante la activación. Se define como un cambio que pone a los esporos en “disposición de germinar”. Al proceso de activación también se le conoce como el periodo de tiempo desde que se añade el germinante hasta que se inicia la germinación. Tras la activación de los esporos se produce la unión del germinante con el receptor de la germinación específico. Una vez iniciada la germinación el proceso es irreversible, incluso tras retirar el germinante del medio (Yi y Setlow 2010).

1.4.2. Fase I germinación

Durante la Fase I de la germinación se produce la liberación de hidrogeniones, cationes monovalentes y zinc, probablemente desde el núcleo que hace aumentar el pH del mismo de 6,5 a 7,7. Posteriormente se produce la liberación de DPA y cationes divalente de calcio y finalmente se sustituye el DPA por agua, lo que provoca la hidratación del núcleo, el aumento del tamaño del espora, la pérdida de su refringencia y una disminución de la resistencia al calor y a otros agentes físicos. Según

esta hipótesis las proteínas SpoVA, que son las responsables de la absorción de DPA durante la esporulación, lo serían también de su liberación durante la germinación (Setlow, 2014).

1.4.3. Fase II germinación

En este estadio se produce la hidrólisis del córtex por parte de una serie de proteínas que degradan específicamente el peptidoglicano del córtex y no de la pared celular. La degradación del córtex se produce por la acción de enzimas conocidas genéricamente como CLEs. Existen dos CLEs presentes en la mayoría de las especies del género *Bacillus*: CwlJ y SleB. La enzima CwlJ, que se activa con la presencia de DPA, es sintetizada por la célula madre y se ancla en las envolturas externas, mientras que la enzima SleB es sintetizada en el endosporo y queda ligada tanto a la membrana interna como a las capas externas del esporo (Moir y Cooper, 2015). Como consecuencia de la acción enzimática, está hidrólisis produce la descompensación del protoplasto y su rehidratación completa, alcanzándose un nivel similar al de una célula vegetativa. Este contenido de agua permite el inicio de un metabolismo con la síntesis de compuestos macromoleculares y la consiguiente transformación en una célula vegetativa (Setlow, 2006).

1.4.4. “Outgrowth”

El “outgrowth” es la etapa final de la germinación donde se van a sintetizar diferentes tipos de lípidos y proteínas para comenzar el crecimiento celular. Como paso previo a los procesos de síntesis se produce la degradación de las proteínas SASP, cuyos aminoácidos se utilizan para la construcción de nuevas proteínas; se generan otros compuestos, como el ácido fosfoglicérico, que se usarán como fuentes de energía (Moir y Cooper, 2015). Aunque esta actividad metabólica se inicia muy rápidamente, la replicación no se inicia hasta 60 minutos después (Setlow, 2014).

1.4.5. Agentes no nutritivos inductores de la germinación

Además de los nutrientes, los esporos pueden germinar por una variedad de sustancias químicas no nutritivas como el dipicolinato de calcio (CaDPA), cationes tensoactivos, como la dodecilamina o agentes físicos como las altas presiones hidrostáticas. El CaDPA permite germinar los esporos que carecen de todos los receptores de germinantes induciendo la germinación por activación de la enzima lítica del córtex CwlJ, es decir, induciendo directamente la fase I y II de la germinación (Setlow, Liu y Faeder, 2012).

Por otro lado, la aplicación de tratamientos térmicos subletales (60°C - 80°C), aunque por sí mismos no activan la germinación, aceleran y sincronizan la respuesta de los receptores de

germinación en presencia de sus nutrientes específicos, es decir, el calor da lugar a que los receptores de la germinación sean más sensibles a los agentes germinantes nutritivos (Luu, et al, 2015). Estos tratamientos se conocen como la activación térmica de la germinación. Su efecto se ha atribuido a los cambios que podría inducir el calor en la estructura de los receptores de germinación o en la membrana interna que los rodea (Luu, et al, 2015).

1.5. Heterogeneidad en la germinación

Se ha observado que existe una gran heterogeneidad en la velocidad de germinación entre esporos individuales procedentes de una misma población y la cantidad de receptores de la germinación presentes en cada espora. Los esporos que responden más lentamente o no responden a los germinantes nutritivos o químicos, se les llama esporos superlatentes. Además, se ha observado que los esporos superlatentes de *Bacillus* poseen una mayor resistencia térmica que los esporos latentes y un menor contenido de agua en el protoplasto (Ghosh y Setlow, 2009; Setlow, Liu y Faeder, 2012). Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, la presencia de esporos superlatentes complica de forma notable la predicción de los tratamientos necesarios. Se generan desconfianzas en la efectividad de los tratamientos de esterilización, puesto que estos esporos pueden permanecer en estado ametabólico y, por tanto, indetectable, durante largos periodos de tiempo y después germinar y proliferar, causando el deterioro de los alimentos o incluso toxiinfecciones alimentarias.

Algunos autores han propuesto también la existencia de una superlatencia transitoria, que desaparecería durante el almacenamiento a 4°C, es decir, que algunos esporos superlatentes mostrarían mayor capacidad para germinar tras un tiempo de almacenamiento (Ghosh y Setlow, 2010). En cualquier caso, todavía se desconocen las causas moleculares por las cuales los esporos superlatentes responden peor a los estímulos de germinación. Inicialmente se atribuyó la existencia de esporos superlatentes a nutrientes a las variaciones estocásticas en el número de receptores de germinación entre los esporos (Ghosh y Setlow, 2009), pero estudios posteriores demostraron que esta no es la única causa (Zhang y Mathys 2019).

La composición y características físico-químicas de las matrices donde se encuentran los esporos puede afectar su capacidad de germinación y la proporción de esporos superlatentes. Se ha demostrado que la refrigeración, el pH y la baja actividad de agua (a_w) fuera del rango de los valores óptimos inhibe o retrasa la germinación y/o crecimiento, además de alterar la proporción de esporos superlatentes (Freire, Condón y Gayán, 2024). Luego estos factores son cruciales para la conservación de los alimentos ya que pueden actuar como barreras frente al desarrollo de los esporos. Los alimentos son generalmente ricos en nutrientes y se ha observado que esporos de *B. cereus* germinan

menos eficientemente en medios ricos en comparación con nutrientes específicos, probablemente debido a la sobreestimulación simultánea de varios receptores de germinación (Zhang et al, 2010).

La temperatura de esporulación también se ha visto que afecta en gran medida a la dinámica de germinación de los esporos de *B. subtilis*. Esporos obtenidos a temperaturas inferiores y superiores a las óptimas presentan una cinética de germinación diferente, tanto en presencia de un medio rico en nutrientes como germinantes nutritivos (Freire, Condón y Gayán, 2024). Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, la importancia de este fenómeno radica en que los esporos contaminantes de los alimentos proceden de orígenes muy diversos (suelo, instalaciones industriales, sistema gastrointestinal) donde han podido esporular bajo condiciones no óptimas.

Aunque durante años se ha estudiado el proceso de germinación en sí y el impacto de las condiciones de esporulación y germinación en la respuesta de los esporos, los mecanismos se desconocen. Además, estos estudios se han llevado a cabo en una serie de organismos modelo de laboratorio, en particular con cepas de *B. subtilis* y *B. cereus*, cuyo comportamiento no representa al de los esporos aislados de los alimentos. Por otro lado, estos estudios se realizan en condiciones ambientales ideales de laboratorio, por ejemplo, utilizando nutrientes específicos como L-alanina o AGFK que raramente se encuentran en los alimentos, o estudian el efecto de un factor ambiental de esporulación o germinación manteniendo el resto de factores en condiciones idóneas, lo que no reproduce lo que ocurre en la conservación de los alimentos.

Por lo tanto, existe una necesidad cada vez mayor de comprender y predecir qué proporción de esporos puede sobrevivir a ciertos métodos de inactivación y si posteriormente pueden germinar, amenazando en última instancia a la calidad y seguridad de los alimentos, así como qué proporción de esporos puede germinar y a qué velocidad frente a ciertos estímulos para desarrollar métodos de germinación-inactivación efectivos. Todo ello debe tener en cuenta las condiciones ambientales de esporulación y germinación. Además, se requieren más estudios para identificar qué componentes del espora y cuáles de los genes que los controlan intervienen en la heterogeneidad de la germinación, tanto la intrínseca como la derivada de las diferentes condiciones ambientales de germinación e inactivación. También se debe estudiar el papel de los receptores de la germinación y otros componentes celulares relevantes en la germinación y el crecimiento en diferentes cepas, así como en diferentes alimentos (Wells-Bennik, 2016).

1.6. Estudio de la fisiología de los esporos bacterianos mediante mutantes “*knock-out*”.

La cantidad de genes y genomas bacterianos secuenciados está aumentando rápidamente debido a las nuevas tecnologías de secuenciación y a las iniciativas de microbioma y metagenómica. Sin embargo, incluso en las bacterias mejor estudiadas, *E. coli* y *B. subtilis*, más del 30% de los genes tienen una función desconocida o están insuficientemente caracterizados. Este déficit limita tanto la anotación de genes mediante genómica comparada como la capacidad de aprovechar la información genómica para comprender y manipular el comportamiento de las bacterias. *B. subtilis* es especialmente relevante en este contexto como organismo modelo clave entre las bacterias Gram-positivas. Ofrece una variedad de herramientas poderosas en los campos de la genética, biología molecular y celular y genética, y es capaz de realizar procesos de diferenciación celular como la morfogénesis de biopelículas, la competencia y la esporulación.

Los fenotipos son clave para caracterizar la función genética y generalmente se identifican estudiando la respuesta de un mutante “*knock-out*” al estrés ambiental. En la era de la genómica, se utilizan ampliamente dos enfoques para identificar los genes involucrados en los fenotipos de una manera de alto rendimiento: el cribado de una librería de mutantes generada aleatoriamente por medio de un transposón o la caracterización de una librería comercial de delección ordenada (Koo et al, 2017).

Koo et al. (2017) han desarrollado dos librerías de mutantes “*knock-out*” mediante la delección de genes no esenciales, comprendiendo un total de 3.968 y 3.970 genes, respectivamente. Estas librerías han permitido actualizar el conjunto de genes esenciales conocidos para este organismo, proporcionando un compendio completo de genes auxotróficos de *B. subtilis* e identificando genes necesarios para utilizar fuentes específicas de carbono y nitrógeno, así como aquellos necesarios para el crecimiento a baja temperatura. Además, se han identificado enzimas que catalizan varios pasos esenciales en la biosíntesis de aminoácidos.

Sayer, Barat y Pophan (2019) identificaron nuevos genes implicados en la germinación de los esporos mediante secuenciación de transposones (Tn-seq). Así, seleccionaron genes que codificaban proteínas de la membrana interna de los esporos y estudiaron la germinación en respuesta a L-valina de cada mutante. Como resultado, observaron que 14 cepas mutadas tenían un defecto en la fase I de la germinación correlacionado con diferentes niveles del receptor GerA. Este trabajo es el único donde se han estudiado los genes implicados en la germinación en presencia de un nutriente y que pone de manifiesto la participación de muchos más genes de los conocidos hasta la fecha.

Por tanto, es necesario ampliar el estudio a otros germinantes que actúan por distintos mecanismos, así como investigar el efecto de las condiciones ambientales en la esporulación y germinación.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La sociedad humana demanda cada vez más a la industria alimentaria la producción de alimentos seguros, inocuos y estables. Además, debido a la globalización del mercado se exigen productos con una vida útil mucho más prolongada. Para conseguir este objetivo es necesario garantizar el control de microorganismos patógenos y alterantes, siendo las bacterias esporuladas uno de los principales problemas en la industria alimentaria, debido a su alta resistencia a tratamientos térmicos moderados y su capacidad de germinación durante el almacenamiento. Como consecuencia, causan alteraciones alimentarias, pérdidas económicas e incluso, algunas especies patógenas de *Bacillus* y *Clostridium*, toxiinfecciones alimentarias.

Aunque los tratamientos térmicos de esterilización puedan asegurar la inocuidad de los alimentos, paralelamente causan la pérdida de las características organolépticas y nutricionales de algunos alimentos. Para controlar los esporos en productos que no pueden ser sometidos a tratamientos térmicos intensos sin comprometer su calidad, se deben emplear combinaciones de obstáculos como refrigeración, acidificación, baja actividad del agua y/o adición de compuestos antimicrobianos (Freire, Condón y Gayán, 2024). La dificultad en el control y el desarrollo de métodos efectivos para su germinación-inactivación radica en la gran variabilidad del comportamiento de los esporos entre diferentes especies y cepas, e incluso entre individuos de una misma población. Aunque se conocen qué cambios de las condiciones de esporulación modifican tanto la resistencia al calor como la capacidad de germinación, así como el efecto de las condiciones ambientales durante la germinación en la cinética del proceso, las causas y los factores moleculares implicados apenas han sido estudiados.

El principal objetivo de este Trabajo de Fin de Grado es identificar nuevos genes de las bacterias esporuladas que estén implicados en el proceso de germinación. Para ello, se ha trabajado con una colección de mutantes “*knock-out*” de *B. subtilis* como organismo modelo (Koo et al., 2017). Para ello, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

1. Cribado de mutantes “*knock-out*” que presenten diferencias en la cinética de germinación con respecto a la cepa parental en presencia de diferentes germinantes nutritivos y químicos.

2. Confirmación de las diferencias fenotípicas de los mutantes seleccionados con respecto a la cepa parental.

3. Verificación de la ausencia de los genes presuntamente ausentes en los mutantes seleccionados.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Microorganismos y cultivo

En este trabajo se ha utilizado la cepa de *B. subtilis* 168 como cepa parental o “*Wild Type*” (WT) y una colección de mutantes “*knock-out*” obtenidos a partir de la sustitución de cada uno de los genes no esenciales de dicha cepa parental por un gen de resistencia a la eritromicina y lincomicina (Koo, 2017). En total, se utilizaron 119 mutantes seleccionados al azar. Todos los microorganismos se conservaron a una temperatura de -80°C en glicerol 25%.

Para la obtención de los esporos de cada una de las cepas, se revitalizaron las células en un tubo de ensayo que contenía caldo nutritivo (Oxoid, Madrid, España) enriquecido con un 0,6% (p/v) de extracto seco de levadura (CNEL) (Oxoid) y una concentración de 1,0 µg/ml y 12,5 µg/ml de eritromicina y lincomicina respectivamente, para evitar el crecimiento de otros microorganismos contaminantes. Estos tubos se incubaron en estufa de aire forzado (PSELECTA, Barcelona, España) a 37 °C durante 24 horas con una agitación de 130 rpm (Unimax 2010, Heidolph, Acwabach, Alemania).

3.2. Esporulación

Las suspensiones de esporos que se han estudiado a lo largo de este trabajo se habían obtenido previamente en el grupo de investigación A03_20.

Para obtener dichas suspensiones, se utilizó medio sólido de esporulación Zeu enriquecido con MnSO₄ CaCl₂ y MgCl₂. Cuando se esporuló, se sembraron 2 placas por cada una de las cepas mutantes y 4 placas para la cepa parental. Cada placa se sembró con 100 µl del cultivo líquido y se llevaron a incubar a 37 °C. El ritmo de esporulación se evaluó mediante un recuento microscópico y también por recuento en placa tras aplicar a la muestra un tratamiento de pasteurización. Una vez optimizadas las condiciones de cultivo (medio Zeu sólido durante 72 horas de incubación), se realizaron tres lotes de esporulación en semanas distintas, en los que se incluían entre 20 y 40 mutantes, siempre junto con la cepa parental. Tras transcurrir el tiempo de esporulación, se recogieron los esporos generados en las placas. Para ello, se echó 2 ml de agua destilada en cada placa y se rascó con un asa de Drigalsky, se recogió todo el líquido de la placa y se llevó a un Eppendorf, obteniéndose así un Eppendorf por placa. Los esporos de cada Eppendorf se lavaron mediante tres centrifugaciones a 14200 rcf durante 10 minutos (MiniSpinPlus, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y

resuspendiéndolos en agua destilada. Tras este lavado, más del 95% de las células observadas con el microscopio eran esporos. Las suspensiones se conservaron en congelación a -30 °C hasta su uso.

3.3. Cinética de germinación

La cinética de germinación de los esporos se evaluó en presencia de caldo nutritivo 50 g/L con extracto de levadura al 0,6 % suplementado con ampicilina 100 µg/mL (CNEL) y las soluciones de L-alanina 0,1 M y la mezcla AGFK, formada por L-asparagina 0,1 M, D-glucosa 0,1 M, D-fructosa 0,1 M y KCl 0,1 M (Sigma Aldrich, Misuri, Estados Unidos), como germinantes nutritivos. Por otro lado, se empleó el dipicolinato de calcio (CaDPA) como agente químico.

Todos los nutrientes se disolvieron en agua destilada mientras que el CaDPA se preparó disolviendo por un lado ácido dipicolínico (0,05 M) en HEPES 0,054 M (Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico) pH 7 y, por otro lado, CaCl₂ 0,05 M en agua destilada. Todas las disoluciones se esterilizaron por filtración.

Los esporos se ajustaron a densidad óptica 1 realizando para ello diluciones seriadas y midiendo la absorbancia de cada suspensión en un lector de placas (TECAN, GENIOS, Berna, Suiza).

3.3.1. Cinética de germinación mediante espectrofotometría

Partiendo de las suspensiones de esporos de todos los mutantes junto con la cepa parental ajustadas a densidad óptica 1, se cribaron los mutantes para seleccionar aquellos que presentaran diferencias significativas en su cinética de germinación con respecto a la cepa parental. Para ello, se depositaron 75 µl en placas multipocillo de 96 pocillos junto con 60 µl de HEPES 0,1 M pH de 7 y 15 µl en el caso de L-alanina y AGFK. En presencia de CNEL, se añadieron 75 µl de germinante y en el caso de CaDPA, se usaron 60 µl de ácido dipicolínico disuelto en HEPES 0,1 M y 15 µl de CaCl₂ 0,1 M.

La cinética de germinación se realizó en un lector de placas (CLARIOstar plus BMG labtech, Madrid, España), ajustado para realizar medidas de absorbancia a 600 nm cada 3 minutos durante 4 horas, a 37 °C, previa agitación. Este equipo consiste en un espectrofotómetro que permite medir la caída de absorbancia de los esporos al detectar la pérdida de refringencia que ocurre durante el proceso de germinación.

Como resultado, con los valores de absorbancia obtenidos a lo largo del tiempo se calculó el porcentaje de caída de absorbancia con respecto al valor de absorbancia registrado a tiempo inicial (t_0) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ caída Abs} = \frac{Abs \ t}{Abs \ t_0} \times 100$$

Ecuación 1: Cálculo del porcentaje de caída de absorbancia.

3.3.2. Cinética de germinación mediante recuento en placa

Una vez realizada la criba de los mutantes, se utilizó un método que permitió confirmar la cinética de germinación con una mayor fiabilidad de los resultados y mayor tiempo de germinación.

En este caso, se estudió la cinética de germinación de los mutantes seleccionados con AGFK y CaDPA en tubos de ensayo, manteniendo las mismas concentraciones de germinantes y proporción de esporos que en la germinación mediante espectrofotometría. Los tubos se incubaron a 37 °C, con 130 rpm de agitación durante 24 horas, tomando una muestra de la suspensión en germinación cada 2 horas hasta las 12 horas y cada 3 horas hasta las 24 horas. Las muestras de cada tiempo se sembraron antes y después de pasteurizar a 70 °C durante 10 minutos (Incubador FX, Zeulab, Zaragoza, España) en ANEL (Agar Nutritivo con Extracto de Levadura 0,6 %) por homogeneización en masa para evaluar la magnitud de la germinación. Una vez incubadas las placas a 37 °C durante 24 horas, se realizó el recuento de supervivientes en un contador automático de colonias (Protos, Analytical Measuring Systems, Cambridge, Reino Unido), adaptado para el recuento de placas densamente pobladas (Condón et al., 1996).

De esta forma, a partir de los recuentos, se calculó el porcentaje de germinación según la siguiente ecuación, donde UFC/ml AP y UFC/ml DP se corresponde con los recuentos antes y después del tratamiento térmico, respectivamente.

$$\text{Ecuación 2: \% Germinación} = 100 - \left(\frac{\text{UFC/ml DP}}{\text{UFC/ml AP}} \times 100 \right)$$

3.4. Modelización matemática

Los datos de germinación obtenidos tanto mediante espectrofotometría como por recuento en placa se representaron frente al tiempo mediante el software GraphPad PRISM8[®] (GraphPad Software, California, EE. UU.). Las cinéticas de germinación se ajustaron al modelo *“Plateau followed by one phase decay”* representado en la Figura 3 y descrito por la Ecuación 3. En este modelo, los parámetros más relevantes para comparar las cinéticas de germinación son: X_0 , que representa la duración del hombro antes de la caída exponencial; Plateau, que refleja el porcentaje de esporos

germinados o la eficiencia de germinación al final de la curva; y K, que es la constante de velocidad de la germinación en la caída exponencial.

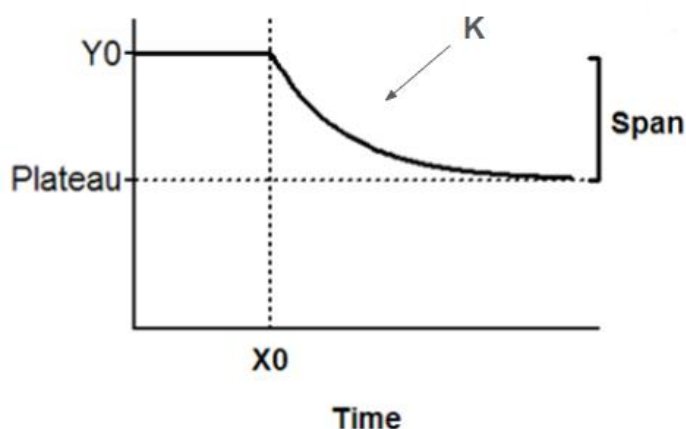


Figura 3: Representación gráfica de la ecuación “*Plateau followed by one phase decay*” dónde: X_0 es el momento en el que comienza la fase de caída y representa el hombro de cada mutante; Y_0 es el valor promedio de Y hasta el tiempo X_0 ; el Plateau es el valor promedio de Y hasta el tiempo X_0 ; K es la constante de velocidad que representa la pendiente de la curva y Span representa la eficiencia de germinación de cada mutante.

$$\text{Ecuación 3: } Y = \text{IF } x(X_0 < X, Y_0, \text{Plateau} + (Y_0 - \text{Plateau})^{(-Kx(X-X_0))})$$

3.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de las cinéticas de germinación se ha llevado a cabo en el software GraphPad PRISM8[®] comparando los valores de los parámetros hombro (X_0), plateau y pendiente (K) de cada mutante con respecto a la cepa parental. Para ello, se aplicó el test ANOVA y se consideraron las diferencias estadísticamente significativas para un *p*-valor < 0,05.

3.6. Verificación de la ausencia del gen en los mutantes seleccionados

Para comprobar si los mutantes seleccionados estaban correctamente contruidos y el gen delecionado había sido sustituido por el cassette de resistencia a eritromicina se realizó una PCR de cuatro mutantes (Applied Biosystems, California, EE. UU.). De esta forma, se amplificó la región del gen diana de cada mutante junto a la cepa parental a partir de una colonia, empleando los cebadores indicados en la Tabla 1, el mix NZYtaq II 2 × Green Master Mix, que contine la enzima polimerasa y los desoxiribonucleótidos (dNTPs), en un volumen final de 20 μ L.

Siguiendo el protocolo indicado por el fabricante, se desnaturalizó el ADN a 95 °C durante 3 minutos para separar la doble hélice del ADN. Posteriormente, se hicieron un total de 35 ciclos donde se produjo la desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, el anillamiento dependiendo de la temperatura de los cebadores (indicados en la Tabla 1) durante 30 segundos y la extensión a 72 °C durante 30 segundos, de acuerdo a la longitud del fragmento amplificado. Finalmente se produjo la fase de extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Tabla 1: Secuencias de los cebadores diseñados para verificar los mutantes seleccionados, junto con sus correspondientes temperaturas de melting (T_m) y longitud del fragmento amplificado.

Mutante	Nombre cebador	Secuencia cebador (5' → 3')	T _m (°C)	Longitud amplificada (pb)
37	OF_spoVT	CGGGCAGAAGCTGTTTGAGC	56,5	1010
	OR_spoVT	CAATACGGTTCACGTATTACCGC		
38	OF_gerD	GTGATAAGCGCCCCGACAGCT	59,6	753
	OR_gerD	GGATTCCAGATCCCGGCTTTC		
102	OF_yhdK	CGGTGTCAATGTATACGGTTCG	56,6	507
	OR_yhdK	CAGCGTAAAGACGCACATCGA		
117	OF_oppB	GATGAAATGCCGTTGCCCC	58	1211
	OR_oppB	GATGAAATGCCGTTGCCCC		

El resultado de PCR se reveló a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se incluyó un control negativo sin ADN y los productos de PCR obtenidos a partir de dos colonias de mutantes y dos colonias de la cepa WT, junto con un marcador de ADN ("DNA Ladder") para comprar el tamaño de los fragmentos amplificados. El gel se dejó correr a voltaje constante de 110 V durante 25 minutos (Bio-Rad, California, EE.UU.) y se reveló mediante la sonda fluorescente SYBR Safe® (Invitrogen).

4.RESULTADOS

4.1. Cribado de mutantes

En primer lugar, se realizó un cribado de 119 mutantes estudiando la cinética de germinación mediante espectrofotometría para seleccionar aquellos que presentaban diferencias significativas en comparación con la cepa WT.

Como se ha mencionado anteriormente, la germinación de los esporos implica la pérdida de la refringencia y, por consiguiente, la disminución de absorbancia de la suspensión. De esta forma, se

puede considerar que el porcentaje de caída de absorbancia se correlaciona con la proporción de esporos que han germinado. En este experimento, se determinó la capacidad de germinación de cada mutante y la cepa parental en presencia de CNEL, L-alanina, AGFK y CaDPA.

De acuerdo con las cinéticas obtenidas para los cuatro germinantes y a partir de la variabilidad observada se escogieron aquellos cuya pendiente (valor K) y/o eficiencia de germinación al final del ensayo (plateau) variara al menos el 35% con respecto a la cepa parental. Así, los mutantes que se seleccionaron fueron el número 2, 21, 37, 38, 69, 94, 102 y 117. Las cinéticas de germinación, así como los valores de los parámetros obtenidos tras la modelización, se muestran en la Figura 4 y Tabla 2. Los resultados del resto de mutantes analizados se encuentran en el apartado Anexos.

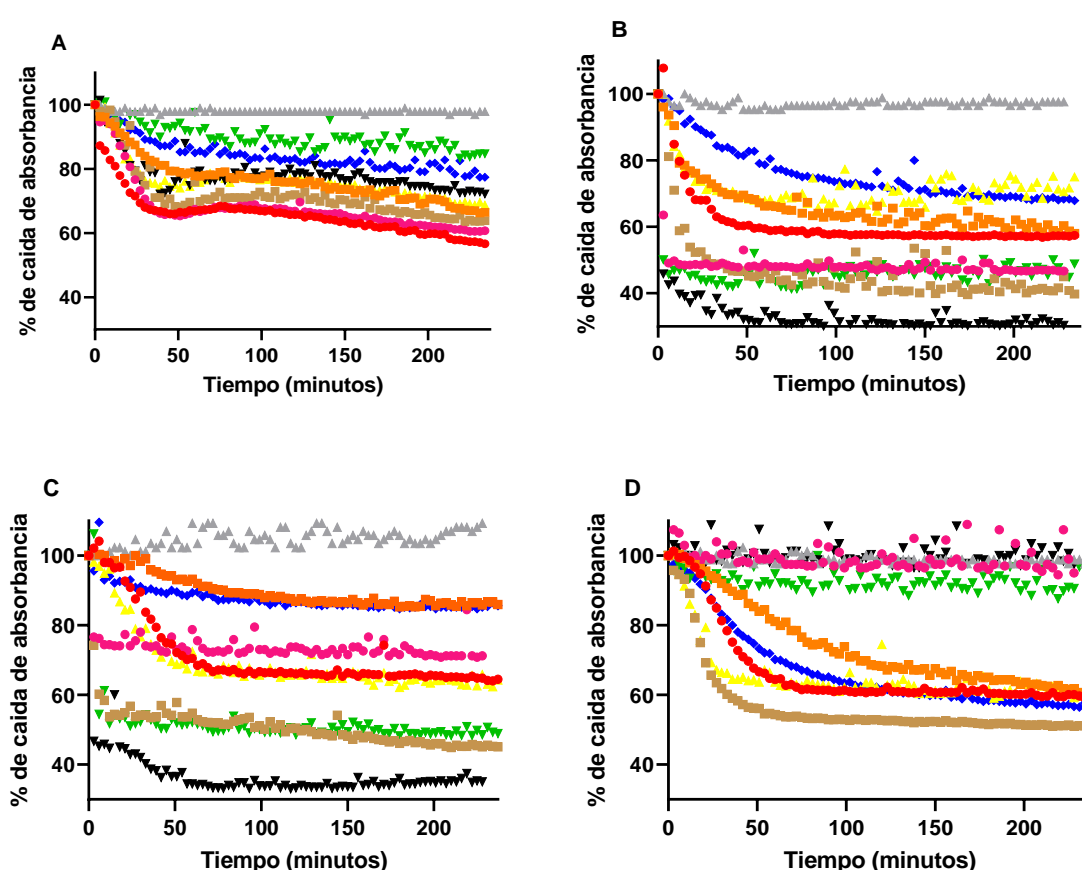


Figura 4: Curvas de germinación de la cepa parental y los mutantes seleccionados con CNEL (4A), L-alanina (4B), AGFK (4C) y CaDPA (4D): WT (●), 2 (■), 21 (▲), 37 (▼), 38 (◆), 69 (●), 94 (■), 102 (▲), 117 (▼).

Tabla 2: Parámetros cinéticos (X_0 , Plateau, K) de germinación obtenidos tras la modelización de las curvas de germinación de la cepa parental y los mutantes seleccionados con CNEL, L-ala, AGFK y CaDPA (Figura 4)

CNEL	WT	2	21	37	38	69	94	102	117
X₀	0	0	5,96	5,30	0	10,61	10,86	5,71	5,02
Plateau	62,96	69,27	74,12	86,49	80,28	64,95	68,58	97,94	76,46
K	0,04	0,01	0,07	0,01	0,01	0,07	0,06	2,48	0,08

L-ala	WT	2	21	37	38	69	94	102	117
X₀	6	0	3,21	1,60	0,23	48	3	992,3	0
Plateau	57,91	61,74	70,12	45,87	68,46	47,64	43,69	98,95	32,27
K	0,09	0,03	0,11	1,82	0,01	0,77	0,11	0,0003	0,40

AGFK	WT	2	21	37	38	69	94	102	117
X₀	18,22	24,36	7,968	3	0	0	0	228,3	0
Plateau	65,58	85,94	64,85	50,4	85,57	73,34	49,84	295,3	35,02
K	0,04	0,02	0,04	0,53	0,02	0,62	0,21	18,23	0,11

CaDPA	WT	2	21	37	38	69	94	102	117
X₀	16,44	13,56	4,703	0	9,674	16025	8,213	3	289,8
Plateau	60,42	59,96	62,28	92,5	57,39	100,4	52,2	97,55	93,92
K	0,05	0,01	0,07	0,05	0,02	0,005	0,06	0,006	0,06

En presencia de CNEL, cabe destacar que la eficiencia de germinación fue menor en todos los mutantes seleccionados con respecto a la cepa WT, siendo esta diferencia más notable en el mutante 102 que no mostró respuesta alguna.

Si analizamos la germinación en presencia de L-alanina, se pueden agrupar los mutantes en cuatro grupos. El primero incluye al mutante 102 que no respondió a la germinación con este germinante. El segundo grupo comprende los mutantes 2, 21 y 38, que presentaron un comportamiento similar a la cepa parental, con una eficiencia y velocidad ligeramente menor. En el tercer grupo se encuentran los mutantes 37, 69 y 94, los cuales presentan una eficiencia de germinación superior a la cepa WT, alcanzando una caída de absorbancia del 55%. Además, también presentaron una velocidad de germinación mayor con valores de la pendiente K superiores a la cepa parental (Tabla 2). Por último, el mutante 117 destacó por tener la eficiencia de germinación más elevada, mostrando una caída superior a la sensibilidad de la técnica (> 40%). En cuanto a la velocidad

de germinación, en el mutante 37 se apreció una K más pronunciada, lo que indica una velocidad de germinación mayor a la de los otros mutantes estudiados y la cepa parental.

Por lo que respecta a la germinación en presencia de la mezcla de AGFK, se distinguieron seis comportamientos diferentes. Este nutriente tampoco indujo la germinación del mutante 102. Los mutantes 2 y 38 presentaron menor eficiencia de germinación, aproximadamente un 15% de caída de absorbancia frente al 40% de caída de la cepa WT, mientras que el mutante 69, teniendo una eficiencia también menor (caída de la absorbancia del 23%), la velocidad fue mucho mayor ya que la germinación se indujo prácticamente al inicio, tal y como se reflejó en el valor de la pendiente K. El mutante 21 mostró una eficiencia de germinación muy parecida a la cepa parental. Por otro lado, los mutantes 37 y 94 presentaron una eficiencia de germinación mayor al alcanzar una caída de hasta el 50%. El mutante 117 mostró la eficiencia de germinación más alta alcanzando una caída del 65%. En cuanto a la velocidad de germinación, el mutante 117 en comparación con la cepa WT presentó una mayor velocidad de germinación destacando entre los demás mutantes.

En el caso del agente químico CaDPA, cabe destacar la escasa respuesta que presentaron los mutantes 37, 69, 102 y 117, siendo remarcable la menor velocidad de los mutantes 69 y 102 con respecto a la cepa parental. Por otro lado, la eficiencia y velocidad de los mutantes 2, 21 y 38 fue muy parecida a la de la cepa WT. Por último, el mutante 94 destacó por una mayor velocidad y eficiencia de germinación, alcanzándose una caída del 55%.

4.2. Optimización de la cinética de germinación mediante recuento en placa

Una vez realizada la criba de los mutantes mediante espectrofotometría, se optimizó la germinación de las suspensiones a lo largo del tiempo por siembra antes y después de un tratamiento de pasteurización. De esta forma, de acuerdo con lo mencionado anteriormente, los esporos bacterianos son capaces de sobrevivir a tratamientos de pasteurización moderados. Sin embargo, este tratamiento inactiva las células vegetativas presentes en la muestra. Por tanto, los ciclos de inactivación de la población inicial de esporos se pueden correlacionar con el porcentaje de germinación durante la exposición a un germinante, con una mayor fiabilidad y precisión que por espectrofotometría (Trunet et al., 2017). Para ello, se optimizó este experimento con la cepa parental de *B. subtilis* en presencia del germinante nutritivo AGFK (Figura 5).

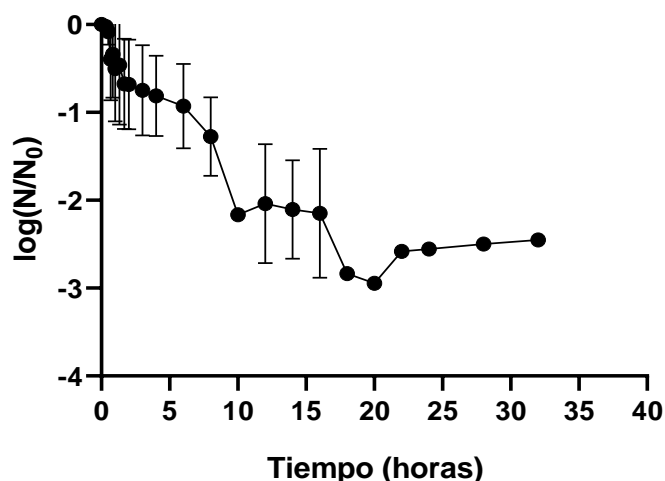


Figura 5: Cinética de germinación de la cepa parental en presencia de AGFK. Se muestran los datos correspondientes a 3 réplicas biológicas junto con su desviación estándar.

Como muestra la Figura 5, durante las primeras casi dos horas se induce la germinación rápidamente de un 63% aproximadamente de la población original. Sin embargo, la velocidad se ralentiza hasta las 8 horas, durante las cuales los recuentos se mantienen constantes. En este punto, es importante destacar que la germinación de la población de esporos se reduce hasta casi un ciclo logarítmico, que continúa germinando hasta llegar incluso a 3 ciclos logarítmicos pasadas las 20 horas. En este punto de la cinética de germinación, prácticamente la totalidad de la población ha germinado (99,9%). Finalmente, se observa una disminución en la velocidad de germinación, generándose una cola desde las 20 horas hasta las 36 horas durante la cual la población se mantiene constante. La población de esporos en esta cola probablemente se deba a la presencia de esporos superlatentes, incapaces de responder al AGFK.

Por tanto, las curvas de espectrofotometría utilizadas para el cribado de los mutantes con diferente patrón de germinación solo permitían evaluar diferencias en la primera fase de germinación más rápida. Por ello, se optó por definir el experimento hasta las 24 horas, al permitir evaluar las dos fases de germinación de los esporos y ser el punto en el que se obtenía el mayor porcentaje de germinación.

4.3. Confirmación de los cambios en la cinética de germinación de los mutantes seleccionados mediante recuento en placa.

Una vez optimizada la técnica de determinación de la eficiencia de germinación por recuento en placa, se decidió utilizar esta técnica para confirmar los cambios de germinación de los mutantes seleccionados con respecto a la cepa parental en presencia de AGFK y CaDPA, como representantes de

un agente nutritivo y otro químico, respectivamente. Se utilizó como nutriente el AGFK porque en comparación con CNEL y L-alanina, se obtuvieron mayores diferencias y más claras en el comportamiento de los esporos mutantes en presencia de AGFK. En la Figura 6 aparecen las curvas de germinación en AGFK de los mutantes preseleccionados (2, 21, 37, 38, 69, 94, 102 y 117) y la cepa parental, y en la Tabla 3 los parámetros cinéticos obtenidos tras la modelización. A pesar que el CaDPA inducía la germinación en las curvas de germinación determinadas por espectrofotometría, no conseguimos que este compuesto funcionara en los experimentos realizados por recuento en placa (datos no mostrados), por causas desconocidas.

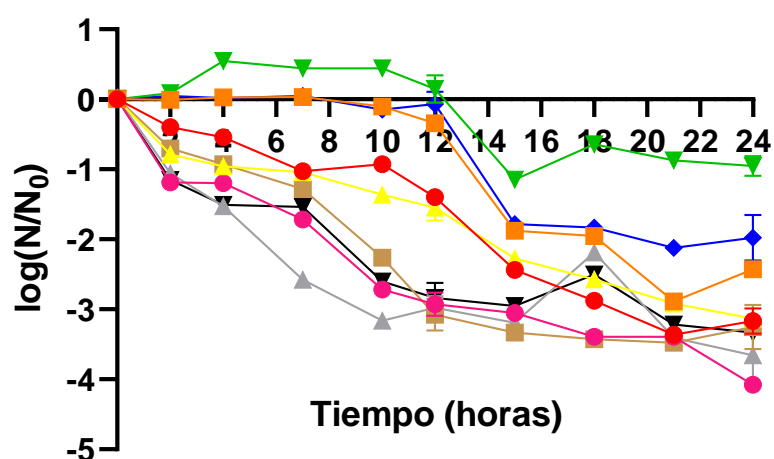


Figura 6: Curva de germinación de la cepa parental y los mutante seleccionados con AGFK: WT (●), 2 (■), 21 (▲), 37 (▼), 38 (◆), 69 (●), 94 (■), 102 (▲), 117 (▼).

Tabla 3: Parámetros cinéticos (X_0 , Plateau, K) de germinación obtenidos tras la modelización de las curvas de germinación de la cepa parental y los mutantes seleccionados con AGFK (Figura 6).

AGFK	WT	2	21	37	38	69	94	102	117
X_0	4,94	9,79	4,18	10	9,75	0	5,64	0,11	5,61
Plateau	-6,38	-2,55	-5,07	-0,91	-1,99	-4,62	-3,40	-3,38	-3,14
K	0,04	0,22	0,04	26,98	0,39	0,07	0,23	0,16	0,3

Como se puede observar en la Figura 6, en presencia de AGFK, el mutante 37 presentó una eficiencia de germinación menor que la cepa parental, y hasta las 12 horas no se inició la germinación. Estos datos no concuerdan con lo observado en la Figura 4C, puesto que en la cinética por espectrofotometría se apreció una caída rápida de la absorbancia en los primeros 15 minutos de hasta el 50%. Estas diferencias podrían deberse a la agregación y precipitación de los esporos en las placas de lectura de absorbancia, donde los esporos se encontraban a mayor concentración. La ausencia de

algunos genes que modulan la estructura y composición de las capas más externas pueden contribuir a este fenómeno. Esto también podría explicar la rápida caída de la absorbancia en L-alanina, aunque no se vio en CNEL y CaDPA (Figura 4).

Los mutantes 2 y 38 presentaron una eficacia de germinación menor en comparación con la cepa parental. Se observa que hasta las 12 horas no comenzaron a germinar, pero a partir de este momento se detectó una rápida caída de los recuentos con una diferencia de dos ciclos logarítmicos entre las 12 y las 15 horas y manteniéndose estable hasta las 24 horas. Sin embargo, los valores K de sus pendientes fueron superiores al de la cepa WT (Tabla 3). Mientras que la reducción en la eficiencia de germinación en los mutantes 2 y 38 coincidía con lo observado por espectrofotometría, los cambios en la velocidad de germinación difieren entre los dos métodos (Tabla 2 y 3). En las curvas de germinación obtenidas por espectrofotometría, la velocidad de caída de la absorbancia en los primeros 30 minutos fue inferior que en la de la cepa parental, la cual se prolongaba hasta los 60 minutos (Figura 4, Tabla 2). El porcentaje de reducción de absorbancia en los mutante 2 y 38 fue muy bajo, aproximadamente un 15%. Esta variación tan pequeña es imposible de detectar por recuento en placa. En las curvas de germinación por recuento en placa, la concentración de esporos de los mutantes empezó a decrecer a partir de las 12 horas a una mayor velocidad que en la cepa parental. Este cambio no se pudo observar en las curvas de germinación por espectrofotometría, que solo duraron 4 horas.

El mutante 21 presentó un comportamiento muy similar al de la cepa WT (Figura 6, Tabla 3). Este mutante fue seleccionado por su menor longitud de hombro (X_0) en comparación con la cepa parental en los primeros 20 minutos (Figura 4, Tabla 2), lo que no se pudo evaluar en la curva por recuento en placa ya que el primer recuento se hizo a la hora (Figura 6). Se necesita confirmar que este hecho es cierto puntuando mejor las primeras etapas de la curva germinación por recuento en placa.

El resto de los mutantes estudiados presentaron una eficiencia de germinación mayor que la cepa parental (Figura 6, Tabla 3). Cabe destacar que el mutante 69 fue preseleccionado a través de las curvas de espectrofotometría por su menor X_0 y mayor K en comparación con la WT, a pesar de que mostraba una eficiencia de germinación similar (Figura 4, Tabla 2). En las curvas elaboradas por recuento en placa, el mutante 69 no solo presentaba mayor velocidad de germinación que la cepa parental, si no también mayor eficiencia, alcanzando casi 4 ciclos logarítmicos de germinación (Figura 6, Tabla 3). Por otro lado, el mutante 102 que por espectrofotometría no mostró signos de germinación en 4 horas (Figura 4, Tabla 2), en la cinética por recuento en placa presentó una velocidad de germinación mayor que la cepa parental (Figura 6, Tabla 3), alcanzando aproximadamente 1,5

ciclos de germinación a las 4 horas. Esto podría deberse a la diferente metodología empleada. Los ensayos por espectrofotometría se realizaban en placas multipocillo que se incubaban y se agitaban de forma discontinua en el lector de placas, mientras que los experimentos por recuento en placa se realizaban en tubos de ensayo que se incubaban en una estufa con una agitación continua diferente.

4.4. Identificación de la función de los genes eliminados en los mutantes seleccionados

Una vez realizado el análisis de las cinéticas de germinación de los mutantes, se estudió cuáles eran los genes implicados en el comportamiento de cada mutante.

Los mutante 2 y 94 carecían del gen *yxIH* y *ydeG* respectivamente, que codifican un transportador MFS “*major facilitator superfamily*” (MFS). Los transportadores MFS son responsables de transportar un amplio espectro de sustratos, ya sea hacia el interior o hacia el exterior de la célula utilizando la energía almacenada en los gradientes electroquímicos (Drew et al, 2021). El mutante 2 mostró una eficiencia de germinación y/o velocidad de germinación menor en comparación a la cepa parental en presencia de CNEL y AGFK, por lo que la ausencia de ese transportador podría contribuir en la entrada de los nutrientes que desencadenan la germinación. Sin embargo, aunque en el mutante 94 se haya delecionado otra proteína de las mismas características, éste presentaba un comportamiento totalmente diferente al mutante 2, puesto que en AGFK así como en L-alanina y CaDPA poseía una mayor eficiencia y/o velocidad de germinación en comparación con la cepa parental. Por tanto, es posible que *yxIH* y *ydeG* realicen funciones muy distintas en el esporo.

En el mutante 21 se ha delecionado el gen *yclP*, que codifica una proteína transportadora ABC de unión a ATP (“*ATP-binding cassette*” por sus siglas en inglés). Estos transportadores son un grupo de proteínas transportadoras de membrana que absorben numerosos nutrientes, precursores biosintéticos, oligoelementos y vitaminas, y secretan lípidos, esteroides y una amplia variedad de metabolitos primarios y secundarios. Se han hallado centenares de genes que codifican transportadores ABC esenciales para multitud de funciones celulares (Locher, 2009). El mutante 21 fue seleccionado principalmente por su menor longitud del hombro en presencia de nutrientes y CaDPA en comparación con la cepa WT a partir de las curvas de absorbancia (Figura 4, Tabla 2), aunque como se ha mencionado antes, es necesario confirmar este hecho con una técnica alternativa. De ser cierto, la ausencia de *yclP* podría favorecer la permeabilidad de estos germinantes hacia las capas más internas. Cabe destacar que la actividad de este transportador es dependiente de ATP, y por tanto es probable que Yclp ejerza su función durante el proceso de esporulación, ya que los esporos son metabólicamente inertes.

El mutante 37 carece del gen *spoVT*, que codifica un regulador transcripcional que modula la expresión de varios genes implicados en la esporulación. Ramírez-Peralta et al. (2012) describieron que una mutación deletérea en *spoVT* en *B. cereus* resultaba en esporos con una germinación extremadamente deficiente en nutrientes, y que SpoVT actúa como un represor de la expresión de los operones que codifican los receptores de la germinación. Estos resultados concuerdan con las curvas de germinación de las Figura 4 y Figura 6, donde la eficiencia de germinación en CNEL y AGFK es muy inferior a la de la cepa parental. Sorprendentemente, observamos que este mutante no respondía bien al CaDPA, a pesar de que SpoVT es un represor negativo del operon *spoVA* (Ramírez-Peralta et al., 2012), que codifica los canales de salida de DPA que estimula el CaDPA exógeno (Setlow, Liu y Faeder, 2012). Puede ser que la ausencia de SpoVT provoque otras modificaciones estructurales en el esporo que los haga menos permeables al CaDPA, y por tanto respondan peor al mismo, aunque posean mayor número de canales SpoVA.

El mutante 38 carece del gen *gerD*. Este gen codifica una proteína que se asocia a los receptores de germinación de la membrana interna, formando el germinosoma. Se cree que participa en la transducción de la señal del inicio de germinación una vez que un nutriente se une a su receptor específico (Griffiths et al., 2011). Según Pelczar et al (2007), los esporos de una cepa de *B. subtilis* con una mutación deletérea en el gen *gerD* presentaban defectos en la respuesta frente a los nutrientes L-alanina y AGFK con respecto a la cepa parental, en distinto grado según el nutriente. Los esporos carentes de *gerD* germinaban con L-alanina, aunque a una velocidad menor que la cepa WT. Sin embargo, mostraban igual velocidad, pero menor eficiencia de germinación, en AGFK. Esto concuerda con los datos obtenidos en la cinética por recuento en placa en AGFK, puesto que el mutante 38 presentaba una eficiencia de germinación menor que la cepa parental (Figura 6, Tabla 3). Además, en presencia de L-alanina, el mutante 38 mostraba una caída de absorbancia a las 4 horas del 32%, mientras que en la cepa parental fue del 43% (Figura 2).

El mutante 69 carece del gen *ydaJ*. *B. subtilis* contiene un operón (*ydzA-mntH*) cuyos productos participan en la producción de un exopolisacárido, del cual se conoce poco. La eliminación del gen *ydaJ* en *B. subtilis* hace que las células se agreguen menos en la fase de crecimiento exponencial y que las colonias tengan una morfología diferente (Bedrunka y Graumann, 2016). En los datos de la cinética por recuento en placa con AGFK y la cinética por espectrofotometría con L-alanina, el mutante 69 presentaba una eficiencia de germinación mayor que la cepa parental (Figura 4 y Figura 6), mientras que con CNEL y CaDPA, el mutante mostraba una eficiencia de germinación menor que la cepa WT. Estos resultados sugieren que la ausencia de *ydaJ* podría modificar selectivamente la permeabilidad a distintos germinantes.

El mutante 102, presenta la delección del gen *yhdK*, que codifica el factor anti-Sig M. El factor SigM de *B. subtilis* controla la expresión de genes que tienen una función extracitoplasmática, como el mantenimiento de la homeostasis de la pared celular en condiciones de estrés. La actividad de SigM está regulada por su factor anti-Sig YhdL y la proteína accesoria YhdK. En el mutante 102, la ausencia del factor anti-sigma podría afectar negativamente a las estructuras externas del esporo, tal y como ocurre en las células vegetativas (Zhao, Roistacher y Helmann, 2019). Esto podría explicar por qué el mutante 102 no mostraba signos de germinación en las cinéticas mediante espectrofotometría en presencia de ninguno de los germinantes estudiados (Figura 4). Sin embargo, en la cinética por recuento en placa, la mezcla AGFK indujo la germinación del mutante 102 con una eficacia de germinación mayor que la cepa parental (Figura 6). Se necesitan realizar más pruebas de germinación por recuento en placa para confirmar que este mutante germinaba de forma distinta a la cepa parental en el resto de germinantes (CNEL, L-alanina y CaDPA).

El mutante 117 carece del gen *oppB*, que codifica la permeasa de oligopéptidos OppB. El operón *opp* de *B. subtilis* codifica cinco proteínas: *oppA*, *oppB*, *oppC*, *oppD* y *oppF*. *OppB* y *oppC* son proteínas que atraviesan la membrana y crean poros transmembrana a través de los cuales se importan los oligopéptidos. Las mutaciones en *oppA*, *oppB*, *oppC* y *oppD* bloquean completamente la capacidad de captar oligopéptidos (Solomon et al, 2003). Hasta ahora no se ha relacionado la función de OppB u OppC con la germinación de los esporos. Sin embargo, en este estudio se observa que en presencia de L-alanina y AGFK el mutante 117 presentaba una eficacia de germinación mucho mayor que la cepa parental (Figura 4 y Figura 6). En cambio, en CNEL presentaba un comportamiento similar que la cepa WT y en presencia de CaDPA no mostraba signos de germinación (Figura 4).

En conclusión, según estudios previos y en consonancia con los datos obtenidos en este trabajo, la delección de los genes *spoVT* y *gerD* afecta negativamente a la germinación con nutrientes y/o CaDPA. Por otro lado, este estudio confirma que los genes *yxIH*, *ydeG*, *ydaJ* y *oppB* a pesar de que inicialmente no tenían ninguna relación con la germinación, pueden modular también este proceso.

4.5. Confirmación de la delección del gen diana en los mutantes seleccionados

Para confirmar que los mutantes estudiados presentaban la inserción correcta del *cassette* de resistencia al antibiótico de marcaje (*erm*), y por consiguiente, la ausencia del gen de interés, se realizó una PCR de cuatro mutantes que presentaban las mayores diferencias de comportamientos de germinación diferentes entre sí: *spoVT*, *gerD*, *yhdK* y *oppB*

El tamaño del fragmento amplificado por PCR de cada gen en la cepa parental y en cada uno de los mutantes varía debido a la diferencia de tamaño entre el gen deletado y el *cassette* de resistencia a eritromicina. Por tanto, comparando el tamaño del fragmento amplificado de la misma región del genoma donde se localiza el gen de interés tanto en la cepa parental como en el mutante, se puede determinar si el *cassette* de eritromicina se encuentra en la posición correcta.

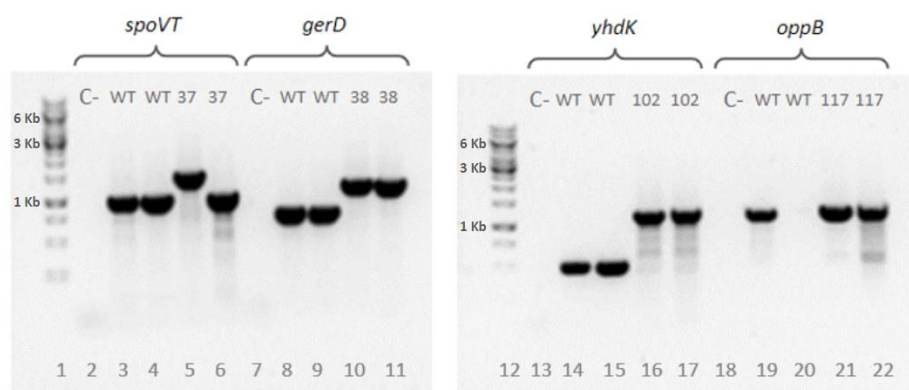


Figura 8: Imagen del gel de electroforesis realizado para revelar el resultado de la PCR y comparar la longitud de los fragmentos amplificados.

Por un lado, en la Figura 8 se observa que en ningún control negativo se visualizó ninguna banda en el gel, por lo que se confirma que no hubo presencia de material genético contaminante en los productos de la amplificación por PCR.

Teniendo en cuenta el diseño de los cebadores, la longitud del producto de PCR del gen *spoVT* es de 1010 pb en la cepa parental, que concuerda con ambas bandas observadas en los carriles 3 y 4. En cambio, la longitud del fragmento amplificado en el mutante *spoVT::erm* (carril 5) es de 1162 pb, coincidente con la banda del marcador, confirmando que el mutante 37 está correctamente construido. El carril 6 del mutante 37 que se aprecia a la misma altura que las de la WT, puede deberse a que la colonia del mutante que se picó como ADN molde no se correspondía con la cepa *spoVT::erm*, ya que este ensayo se volvió a repetir obteniéndose el mismo resultado que en el carril 5.

En el caso de la amplificación del gen *gerD*, se esperaba que el fragmento amplificado tuviera un tamaño de 753 pb tal y como se observa en la Figura 8 (carriles 8 y 9). En cambio, el mismo fragmento en el mutante 38 tendría un tamaño de 930 pb, lo que concuerda con ambas bandas del gel de agarosa, confirmando que el mutante 38 está bien construido.

La longitud del fragmento amplificado del gen *yhdK* en la cepa parental es de 507 pb, que coincidió con las bandas observadas en el gel (carriles 14 y 15; Figura 8). Sin embargo, en el mutante

yhdK::erm la longitud del fragmento amplificado esperado y observado en el gel fue de 951 pb, confirmando que el mutante 102 estaba bien construido.

Por otro lado, la longitud del fragmento amplificado del gen *oppB* en el mutante 117 coincidió con una de las bandas obtenidas en la cepa parental (carriles 21 y 22; Figura 8). A pesar de que la longitud esperada en ambas cepas fue de 1211 pb y 1010 pb respectivamente, no coincidió con los datos observados en el gel. Por lo tanto, en este caso no podemos confirmar la correcta construcción del mutante a partir de los datos observados.

5. CONCLUSIÓN

De los resultados obtenidos en esta investigación se pueden extraer como conclusiones más importantes las siguientes:

Los datos obtenidos mediante cinética por espectrofotometría permiten realizar un cribado preliminar de los mutantes. Sin embargo, puede dar lugar a falsos positivos, ya que algunos esporos mutantes con defectos en la superficie pueden agregarse y precipitar durante el ensayo. Además, algunos mutantes, como el mutante 102 que carece del gen que codifica el anti-SigM YhdK, germinan deficientemente cuando se concentran y se exponen a los germinantes en la placa multipocillo, pero no cuando se incubaban en un tubo de ensayo con menor concentración. Por ello, para confirmar con mayor fiabilidad el comportamiento diferente de cada mutante con respecto a la cepa parental, es necesario utilizar métodos adicionales, como las cinéticas por recuento en placa. Este último método permite tener mayor sensibilidad, ya que detecta hasta 5 ciclos logarítmicos de germinación, pero a diferencia de la espectrofotometría, no permite detectar porcentajes de germinación de pequeña escala (aproximadamente $\leq 20\%$).

Como se ha demostrado anteriormente, la ausencia de los genes *spoVT* o *gerD* empeora la respuesta de los esporos a nutrientes, debido a la subexpresión de los receptores de germinación o a la inhibición de la transducción de la señal del inicio de germinación, respectivamente. En el caso del mutante carente de *spoVT*, observamos por primera vez que tampoco responde bien al CaDPA, a pesar de que *SpoVT* es un regulador negativo de los canales *SpoVA*.

Además, identificamos nuevos genes que hasta ahora no se habían relacionado con la germinación. La ausencia de los genes *yxjH* y *ydeG*, que codifican transportadores MFS, implica comportamientos distintos. Mientras que la delección del primero mejora la eficiencia y/o velocidad de germinación en L-alanina, AGFK y CaDPA, el segundo perjudica a la germinación en CNEL y AGFK. La ausencia del gen *ydaJ*, que participa en la producción de un exopolisacárido, reduce la eficiencia de germinación en L-alanina y AGFK, mientras que la aumenta en CNEL y CaDPA. Por último, la

eliminación del gen *oppB*, que codifica una permeasa transmembrana de oligopéptidos, parece mejorar la eficiencia de germinación en presencia de L-alanina y AGFK, pero inhibe la germinación en CaDPA. Sin embargo, no se pudo confirmar que el gen *oppB* estuviera realmente eliminado en el mutante correspondiente. Finalmente, destacar que se han identificado y confirmado la implicación de tres genes nuevos (*yxIH*, *ydeG* y *ydaJ*) en la germinación a partir de los 119 mutantes estudiados, y que por tanto podrían existir muchos más entre los genes mutados en la librería “*knock-out*” de *B. subtilis*, que consta de 3.968 mutantes en total.

5. CONCLUSION

From the results obtained in this research, the most important conclusions that can be drawn are the following:

The data obtained through kinetic spectrophotometry allow for a preliminary screening of the mutants. However, this method may result in false positives since some mutant spores with surface defects can aggregate and precipitate during the assay. Additionally, some mutants, such as mutant 102, which lacks the gene encoding the anti-SigM YhdK, germinate poorly when concentrated and exposed to germinants in the microplate plate but not when incubated in a test tube with lower concentration. Therefore, to more reliably confirm the different behavior of each mutant compared to the parental strain, it is necessary to use additional methods, such as plate count kinetics. This latter method provides greater sensitivity as it can detect up to 5 logarithmic cycles of germination but, unlike spectrophotometry, it does not detect small-scale germination percentages (approximately $\leq 20\%$).

As previously demonstrated, the absence of the *spoVT* or *gerD* genes worsens the response of spores to nutrients due to the underexpression of germination receptors or the inhibition of germination initiation signal transduction, respectively. In the case of the *spoVT*-deficient mutant, we observed for the first time that it also does not respond well to CaDPA, despite SpoVT being a negative regulator of the SpoVA channels.

Additionally, we identified new genes that had not been previously related to germination. The absence of the *yxIH* and *ydeG* genes, which encode MFS transporters, implies different behaviors. While the deletion of the former improves the efficiency and/or speed of germination in L-alanine, AGFK, and CaDPA, the latter impairs germination in NBYE (Nutrient Broth Yeast Extract) and AGFK. The absence of the *ydaJ* gene, which is involved in the production of an exopolysaccharide, reduces germination efficiency in L-alanine and AGFK, while increasing it in NBYE and CaDPA. Finally, the deletion of the *oppB* gene, which encodes a transmembrane oligopeptide permease, seems to

improve germination efficiency in the presence of L-alanine and AGFK but inhibits germination in CaDPA. However, it could not be confirmed that the *oppB* gene was truly deleted in the corresponding mutant. Finally, it is noteworthy that the involvement of three new genes (*yxjH*, *ydeG*, and *ydaJ*) in germination has been identified and confirmed from the 119 mutants studied, suggesting that there could be many more among the mutated genes in the *B. subtilis* "knock-out" library, which consists of a total of 3,968 mutants.

6. VALORACIÓN PERSONAL

Durante la realización de este Trabajo Fin de Grado, he adquirido una comprensión sobre el funcionamiento de un laboratorio, así como el compromiso y la dedicación necesarios para llevar a cabo un proyecto científico. Este proceso me ha ensañado no solo a planificar y ejecutar experimentos, sino también a interpretar datos de manera crítica, analizar información de manera eficiente y buscar información bibliográfica. Todas las horas invertidas en este trabajo me han permitido desarrollar habilidades esenciales para la investigación científica, reforzando mi capacidad para enfrentar desafíos y avanzar en mis conocimientos dentro del campo de los esporos bacterianos.

También me gustaría expresar mi agradecimiento a Santiago Condón y a Elisa Gayan por darme la oportunidad de trabajar en este campo y por su invaluable ayuda. Agradecer al grupo de Nuevas Tecnologías de Procesado de los Alimentos por ayudarme en todo lo posible. En especial, quiero dar las gracias a Paula Gómara por su infinita paciencia, por enseñarme sobre los esporos bacterianos y por su inestimable contribución para llevar a cabo este trabajo.

7. BIBLIOGRAFÍA

Antequera-Gómez, M.L., Díaz-Martínez, L., Guadix, J.A., Sánchez-Tévar, A.M., Sopeña-Torres, S., Hierrezuelo, J., Doan, H., Leveau, J., Vicente, A. y Romero, D. (2021). "Sporulation is dispensable for the vegetable-associated life cycle of the human pathogen *Bacillus cereus*". *Microbial Biotechnology*, 14(4), pp.1550-1565. DOI: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13816>. McBedrunka, P. y Graumann, P. (2016). "Subcellular clustering of a putative c-di-GMP-dependent exopolysaccharide machinery affecting macro colony architecture in *Bacillus subtilis*". *Environmental Microbiology*, 9(3), pp. 211-222. DOI: 10.1111/1758-2229.12496.

Besten, H., Wells-Bennik, M. y Zwietering, M. (2018). "Natural Diversity in Heat Resistance of Bacteria and Bacterial Spores: Impact on Food Safety and Quality". *The Annual Review of Food Science and Technology*, 9(1), pp. 383-410. DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012808>.

Condón, S., Arrizubieta, M.J. y Sala, F.J. (1993). "Microbial heat determinations by the multipoint system with the thermoresistometer TR-SC Improvement of this methodology". *Journal Microbiology Methods*, 18, pp. 357-366. DOI: [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(93\)90017-C](https://doi.org/10.1016/0167-7012(93)90017-C).

Cho, W. y Chung, M. (2020). "Bacillus spores: a review of their properties and inactivation processing technologies". *Food Science and Biotechnology*, 29, pp. 1447–1461. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00809-4>.

Drew, D., North, R.A., Nagarathinam, K. y Tanabe, M. (2021). "Structures and General Transport Mechanisms by the Major Facilitator Superfamily (MFS)". *Chemical Review*. 121(9), pp. 5289-5335. DOI: 10.1021/acs.chemrev.0c00983.

EFSA (European Food Safety Authority). (2005). "Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to Clostridium spp in foodstuffs. *The EFSA Journal*, 199, pp. 1-65. DOI: <http://epdf/10.2903/j.efsa.2005.199>.

Ehling-Schulz, M., Lereclus, D. y Koehler TM. (2019). "The *Bacillus cereus* Group: Bacillus Species with Pathogenic Potential". *Microbiology Spectrum*, 7(3) pp. 1128-1128. DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018>.

Freire, V., Condón, S. y Gayán, E. (2024) "Impact of sporulation temperature on germination of *Bacillus subtilis* spores under optimal and adverse environmental conditions". *Food Research International*, 182, pp. 114064. DOI: 10.1016/j.foodres.2024.114064.

Gauvry, E., Mathot, A., Leguérinel, I., Ciuvert, O., Postollec, F., Broussolle, V. y Coroller, L. (2017). "Knowledge of the physiology of spore-forming bacteria can explain the origin of spores in the food environment". *Research in Microbiology*, 168(4), pp.369-378. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.10.006>.

Gerhardt, P. y Marquis, R. (1989). "Spores thermoresistance mechanisms" En: Smith, I. Slepecky, R. y Setlow, P. (ed). *Regulation of prokaryotic development*. Washington, DC: American Society Microbiology, pp. 43-63.

Ghosh, S., Setlow, P. (2009). "Isolation and characterization of superdormant spores of *Bacillus* species". *Journal of Bacteriology*, 191(6), pp. 1787-1797. DOI: 10.1128/JB.01668-08.

Ghosh, S. y Setlow, P. (2010). "The preparation, germination properties and stability of superdormant spores of *Bacillus cereus*". *Journal of Applied Microbiology*, 108(2), pp. 582-590. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04442.x>.

Griffiths, K., Zhang, J., Cowan, A., Yu, J. y Setlow P. (2011). "Germination proteins in the inner membrane of dormant *Bacillus subtilis* spores colocalize in a discrete cluster". *Molecular Microbiology*, 81, pp. 1061–1077. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07753.x>.

Keratimanoach, S., Takahashi, K., Kuda, T., Okazaki, E., Geng, JT. y Osako, K. (2022). "Effects of tyndallization temperature on the sterility and quality of kamaboko". *Food Chemistry*, 366, pp. 130692. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.130692.

Koo, B.M., Kritikos, G., Farelli, J.D., Todor, H., Tong, K., Kimsey, H., Wapinski, I., Galardini, M., Cabal, A., Peters, J.M., Hachmann, A.B., Rudner, D.Z., Allen, K.N., Typas, A. y Gross, C.A. (2017). "Construction and Analysis of Two Genome-Scale Deletion Libraries for *Bacillus subtilis*". *Cell Systems*, 22(3) pp. 291-305 DOI: 10.1016/j.cels.2016.12.013.

Kwon, Seung-Wook., Kwon, Eun-Ae., Hong, Yong-Gun. and Kim, Sang-Soon. (2022). "Germination of *Bacillus cereus* ATCC 14579 spore at various conditions and inactivation of the germinated cells with microwave heating and UVC treatment in milk simples". *LWT*, 154(15), pp. 112702. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112702>.

Locher, K. (2009). "Review. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters". *Biological sciences*, 364(1514), pp. 239-45. DOI: 10.1098/rstb.2008.0125.

Løvda, I., Hovda ,M., Granum, P. y Rosnes, J. (2011). "Promoting *Bacillus cereus* spore germination for subsequent inactivation by mild heat treatment". *Journal Food Protection*, 4(12), pp. 2079-89. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-11-292.

Luu, S., Cruz-Mora J., Setlow, B., Feeherry, F. E., Doona, C. J. y Setlow, P. (2015). "The effects of heat activation on *Bacillus* spore germination, with nutrients or under high pressure, with or without various germination proteins". *Applied and Environmental Microbiology*, 81(8), pp. 2927-38. DOI: 10.1128/AEM.00193-15.

Markland, SM., Kniel, E., Setlow, P. y Hoover, D. (2013). "Nonthermal inactivation of heterogeneous and superdormant spore populations of *Bacillus cereus* using ozone and high pressure processing". *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19, pp. 44-49. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.05.004>.

McKenney, P., Driks, A. y Eichenberger, P. (2013). "The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat". *Nature Review Microbiology*, 11, pp. 33–44. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2921>.

Misiou, O., Koutsoumanis, K. y Membré, JM. (2023). "Quantitative microbial spoilage risk assessment of plant-based milk alternatives by *Geobacillus stearothermophilus* in Europe". *Food Research International* 166 pp. 112638. DOI: 10.1016/j.foodres.2023.112638.

Moir, A. y Cooper, G. (2015). "Spore germination". *Microbiology Spectrum*, 3(6). DOI: 10.1128/microbiolspec.TBS-0014-2012.

Paredes-Sabja, D., Setlow, P. y Sarker, M.R. (2011). "Germination of spores of Bacillales and Clostridiales species: mechanisms and proteins involved". *Trends in Microbiology*, 19(2), pp.85-94. DOI: 10.1016/j.tim.2010.10.004.

Pelczar, P., Igarashi, T., Setlow, B. y Setlow, P. (2007). "Role of GerD in germination of *Bacillus subtilis* spores". *Journal Bacteriology*, 189(3), pp.1090-1098. DOI: 10.1128/JB.01606-06.

Ramirez-Peralta, A., Stewart, K., Thomas, K., Setlow, B., Chen, Z., Li, Y. y Setlow, P. (2012). "Effects of the SpoVT Regulatory Protein on the Germination and Germination Protein Levels of Spores of *Bacillus subtilis*". *Journal Bacteriology*, 194(13), pp. 504-512. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.00504-12>.

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

Setlow, P. (2003). "Spore Germination". *Current opinion in Microbiology*, 6(6), pp. 550-556. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.10.001>.

Setlow, P. (2006). "Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals". *Journal of Applied Microbiology*, 101, pp. 514-525. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x>.

Setlow, P., Liu, J.T. y Faeder, J.R. (2012). Heterogeneity in Bacterial Spore Populations, in: Abel-Santos, E. (Ed.), *Bacterial spores: current research and applications*. Caister Academic Press, U.K., pp. 199-214.

Setlow, P. (2014). "Germination of Spores of *Bacillus* Species: What We Know and Do Not Know". *Journal Bacteriology*, 196(7), pp.1413-1455. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.01455-13>.

Setlow, P., Wang, S. y Li, Y. (2017). "Germination of spores of the orders *Bacillales* and *Clostridiales*". *Annual review of Microbiology*, 71, pp. 459-477. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093558>.

Solomon, J., Su, L., Shyn, S. y Grossman, A. (2003). "Isolation and characterization of mutants of the *Bacillus subtilis* oligopeptide permease with altered specificity of oligopeptide transport". *Journal Bacteriology*, 185(21), pp. 6425-33. DOI: 10.1128/JB.185.21.6425-6433.2003.

Sonenshein, A., Hoch, J. y Losick, R. (2001). "Bacillus subtilis: From Cells to Genes and from Genes to Cells" In *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives* (eds A.L. Sonenshein, J.A. Hoch and R. Losick). <https://doi.org/10.1128/9781555817992.ch1>.

Trunet, C., Carlin, F. and Coroller, L. (2017). "Investigating germination and outgrowth of bacterial spores at several scales". *Trends Food Science Technology*, 64, pp. 60-68. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.03.008.

Webb, M., Barker, G., Goodburn, K.E. y Peck, M. (2019). "Risk presented to minimally processed chilled foods by psychrotrophic *Bacillus cereus*". *Trends Food Science Technology* (93) pp. 94-105. DOI: 10.1016/j.tifs.2019.08.024.

Wells-Bennik, M., Eijlander, R., Besten, H., berendsen, E., Warda, A., Krawczyk, A., Nierop, M., Xiao, Y., Zwietering, M., Kuipers, O. y Abee, T: (2016). "Bacterial Spores in Food: Survival, Emergence, and Outgrowth". *The Annual Review of Food Science and Technology*, 7(1), pp. 457-482. DOI: 10.1146/annurev-food-041715-033144.

Yi, X. y Setlow, P. (2010). "Studies of the commitment step in the germination of spores of bacillus species". *Journal Bacteriology*, 192(13) pp. 3424-3433. DOI: 10.1128/JB.00326-10.

Zhang, P., Garner, W., Yi, X., Yu, J., Li, YQ. y Setlow, P. (2010). "Factors affecting variability in time between addition of nutrient germinants and rapid dipicolinic acid release during germination of spores of *Bacillus* species". *Journal Bacteriology*, 192(14), pp. 3608-3619. DOI: 10.1128/JB.00345-10

Zhang, Y. y Mathys, A. (2019) "Superdormant Spores as a Hurdle for Gentle Germination-Inactivation Based Spore Control Strategies". *Frontiers in Microbiology*, 9, pp. 3163. DIO: 10.3389/fmicb.2018.03163

Zhao, H., Roistacher, D. y Helmann, J. (2019). "Deciphering the essentiality and function of the anti- σ^M factors in *Bacillus subtilis*". *Molecular Microbiology*, 112(2), pp. 482-497. DOI: <https://doi.org/10.1111/mmi.14216>.

8. ANEXOS

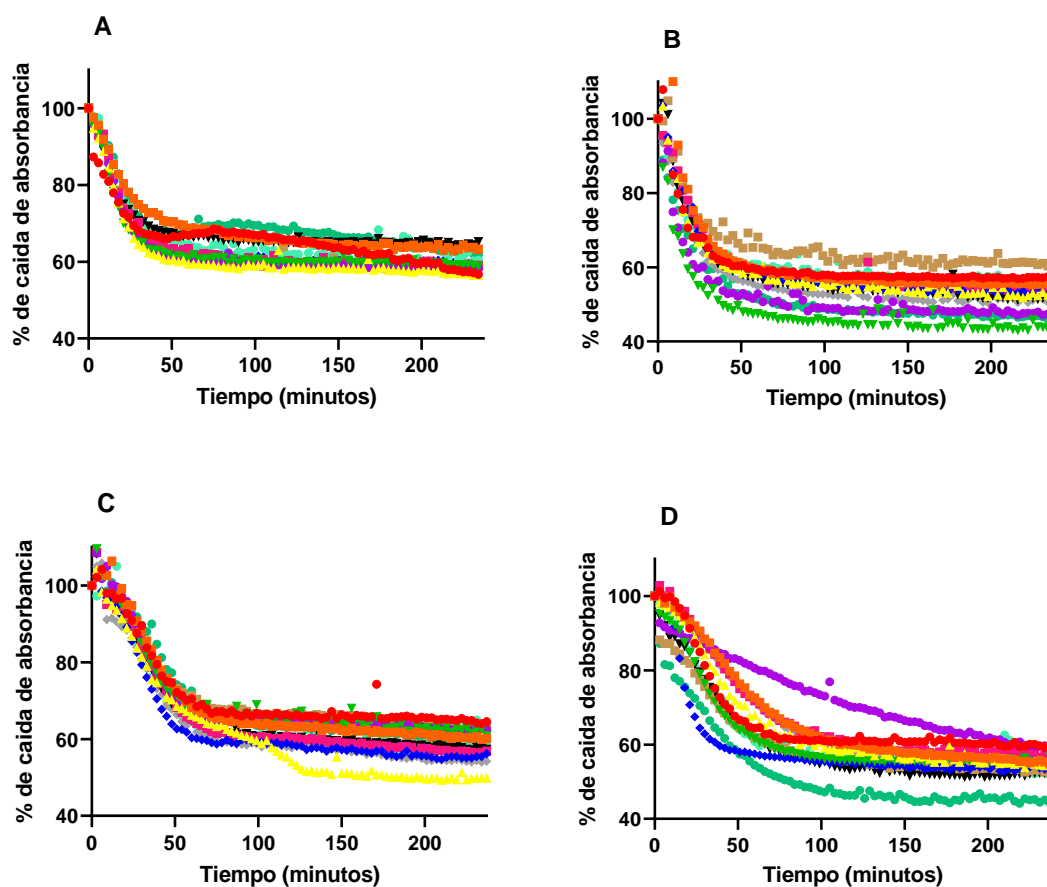


Figura I: Germinación de los mutantes seleccionados WT (●), 1 (■), 3 (▲), 4 (▼), 5 (●), 6 (◆), 7 (●), 8 (■), 9 (■), 10 (▼), 11 (◆), 12 (●) con CN (A), L-alanina (B), AGFK (C) y CaDPA (D).

Tabla I: Modelización de los mutantes seleccionados con CN, L-ala, AGFK y CaDPA según el hombro (X0), el Plateau y la pendiente (K).

CN	WT	1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
X0	0	1,07	4,67	2,47	5,48	4,62	5,11	2,81	4,99	3,77	4,73	6,97
Plateau	62,96	64,45	58,12	59,88	66,31	60,25	59,14	59,74	58,94	65,19	59,71	62,89
K	0,04	0,03	0,06	0,06	0,06	0,05	0,06	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06

L-ala	WT	1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
X0	6	6,95	3	0	0	3	0	4,23	5,77	3,88	0	0
Plateau	57,91	56,5	54,24	44,99	47,76	54,44	48,8	55,05	62,14	53,6	51,94	57,08
K	0,09	0,06	0,05	0,06	0,04	0,04	0,06	0,04	0,05	0,05	0,04	0,04

AGFK	WT	1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
X0	18,22	6	3,71	13,71	15,27	14,06	16,83	6	6	9,04	5,77	15,62
Plateau	65,58	61,27	48,37	60,74	60,74	63,41	57,66	63,92	58,5	55,29	55,29	59,93
K	0,04	0,03	0,01	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02	0,04

CaDPA	WT	1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
X0	16,44	18,31	15,47	13,14	0	8,19	0	16,11	6,68	12,13	15,14	6,97
Plateau	60,42	55,32	55,43	55,49	44,73	54,6	45,92	57,2	53,43	51,67	51,88	62,89
K	0,05	0,02	0,02	0,03	0,02	0,07	0,005	0,02	0,02	0,02	0,01	0,06

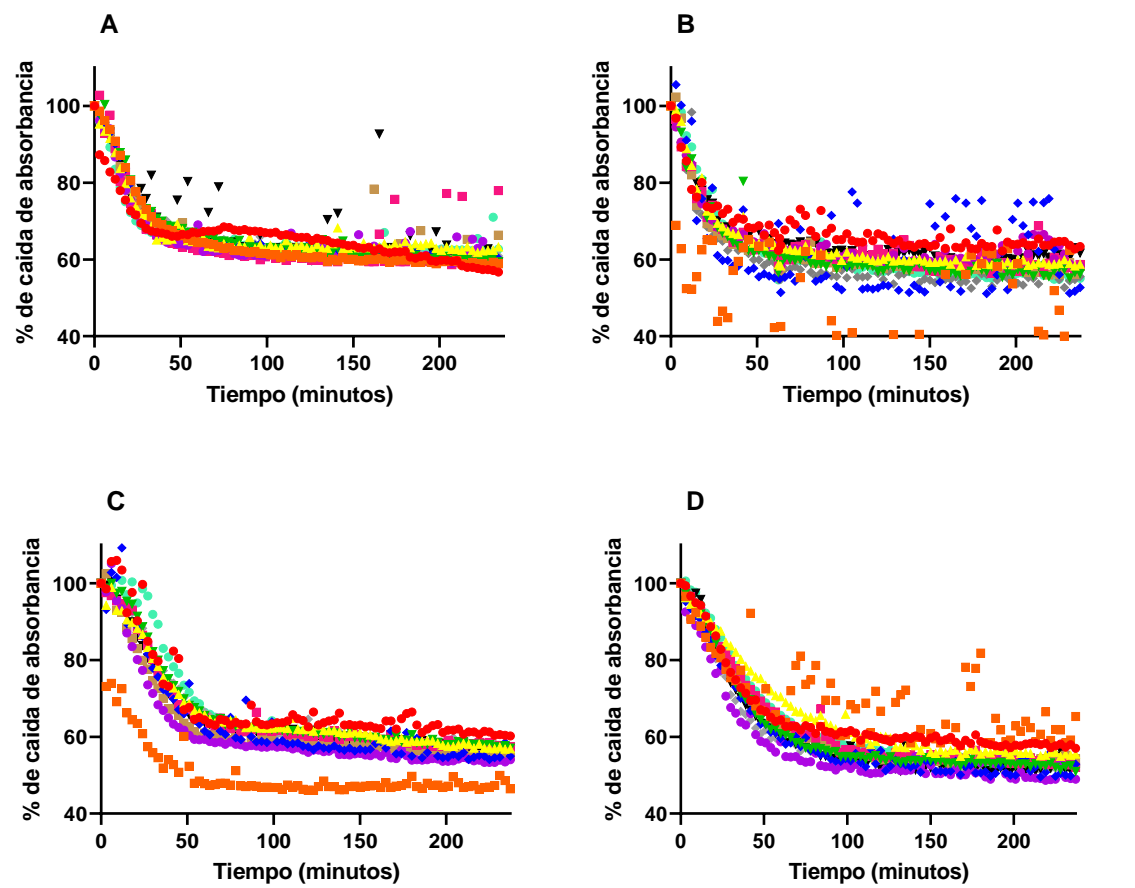


Figura II: Germinación de los mutantes seleccionados WT (●), 13 (■), 14(▲), 15 (▼), 16 (◆), 17 (●), 18 (■), 19 (■), 20 (▼), 22(◆), 23 (●) con CN (A), L-alanina (B), AGFK (C) y CaDPA (D).

Tabla II: Modelización de los mutantes seleccionados con CN, L-ala, AGFK y CaDPA según el hombro (X0), el Plateau y la pendiente (K).

CN	WT	13	14	15	16	17	18	19	20	22	23
X0	0	4,67	5,17	5,64	2,69	5,23	7,98	4,54	0	2,44	4,42
Plateau	62,96	59,79	63,28	61,33	61,23	61,89	61,46	61,77	62,16	61,49	63,37
K	0,04	0,03	0,06	0,04	0,03	0,06	0,07	0,04	0,03	0,03	0,07

L-ala	WT	13	14	15	16	17	18	19	20	22	23
X0	0	45	2,14	0,66	7,54	0,71	0,23	3	0	4,65	2,84
Plateau	64,92	44,22	59,72	57,37	60,17	61,14	59,9	58,5	61,23	55,7	56,57
K	0,04	0,15	0,04	0,04	0,11	0,05	0,05	0,06	0,04	0,05	0,03

AGFK	WT	13	14	15	16	17	18	19	20	22	23
X0	13,43	47,28	7,71	14,17	18	6,81	14,21	4,82	8,22	10,83	20,56
Plateau	62,42	47,3	58,65	58,93	57	55,02	58,98	56,52	58,48	58,29	58,12
K	0,04	0,34	0,02	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03

CaDPA	WT	13	14	15	16	17	18	19	20	22	23
X0	8,40	0	12,09	10,06	7,10	6,68	9,27	9,68	9,78	5,84	9,20
Plateau	58,45	62,75	54,71	52,76	51,19	50,41	53,29	53,65	51,99	52,43	53
K	0,03	0,02	0,02	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02	0,03	0,03	0,02

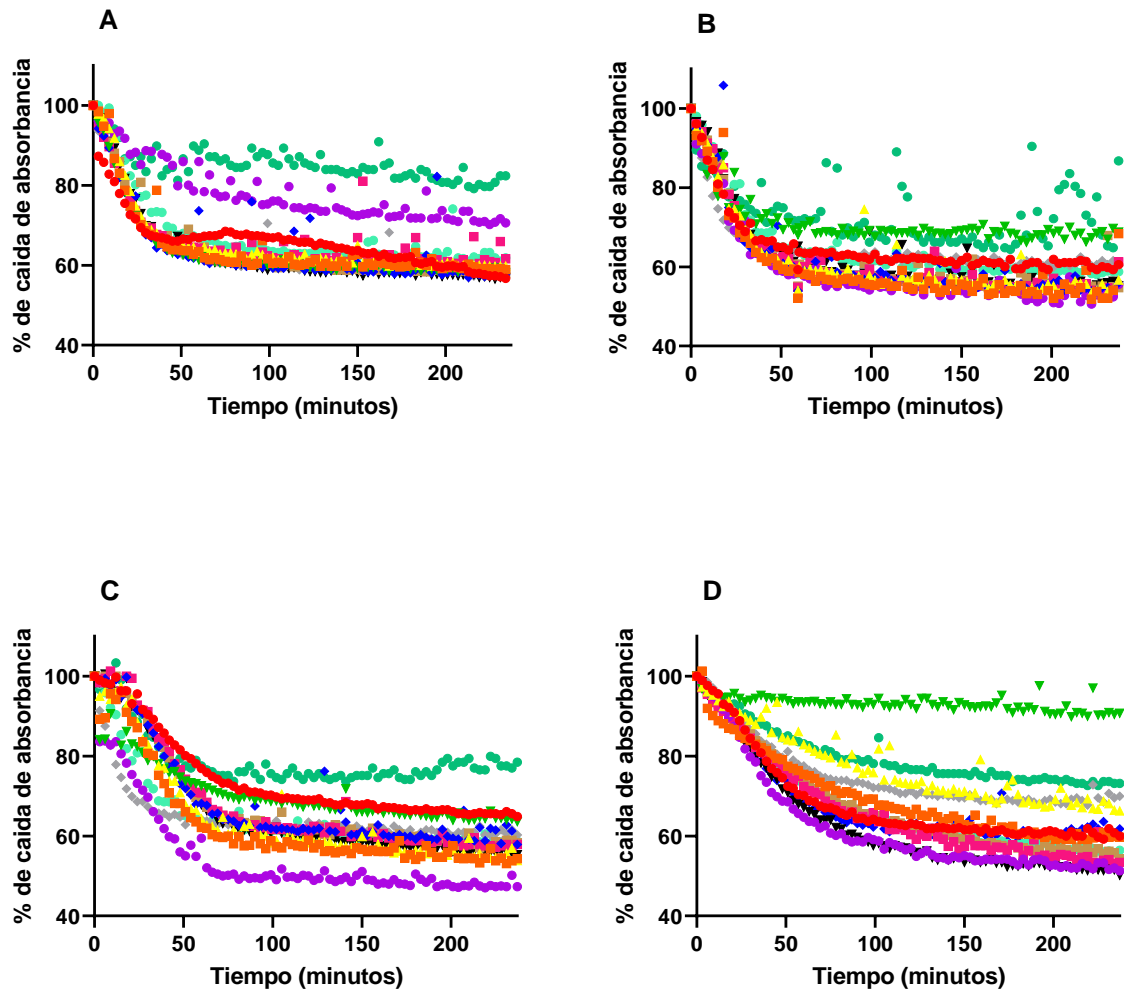


Figura III: Germinación de los mutantes seleccionados WT (●), 24 (■), 25 (▲), 26 (▼), 27, (●), 28 (◆), 29 (●), 30 (■), 31 (■), 32 (▼), 33 (◆), 34 (●) con CN (A), L-alanina (B), AGFK (C) y CaDPA (D).

Tabla III: Modelización de los mutantes seleccionados con CN, L-ala, AGFK y CaDPA según el hombro (X0), el Plateau y la pendiente (K).

CN	WT	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
X0	0	7,22	7,43	2,16	0	1,29	36	1,71	3,18	2,47	0,92	8,45
Plateau	62,96	60,45	60,99	59,46	49,82	60,03	71,71	62,4	59,01	58	59,03	62,98
K	0,04	0,05	0,05	0,05	0,001	0,04	0,02	0,05	0,04	0,03	0,04	0,04

L-ala	WT	24	25	26	27	28	29	10	31	32	33	34
X0	0,83	5,17	4,92	5,57	0	8,51	0	2,65	4,80	5,92	0	3,87
Plateau	61,23	54,8	56,26	68,9	70,74	55,91	53,73	55,7	56,23	56,98	61,77	59,54
K	0,04	0,04	0,04	0,09	0,04	0,04	0,03	0,03	0,04	0,04	0,06	0,03

AGFK	WT	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
X0	12,73	0	0	0	14,57	12,34	7,83	0,27	6,18	9,32	7,57	7,14
Plateau	60,57	57,56	63,49	85,65	75,97	60,74	52,72	52,76	54,2	51,28	68,77	55,54
K	0,02	0,01	0,009	0,002	0,06	0,03	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01

CaDPA	WT	24	25	26	27	28	29	30	21	32	33	34
X0	12,73	0	0	0	0	12,34	7,83	0,27	6,18	9,32	7,57	7,14
Plateau	60,57	57,56	63,49	85,65	72,71	60,74	52,72	52,76	54,2	51,28	68,77	55,54
K	0,02	0,01	0,009	0,002	0,01	0,03	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01

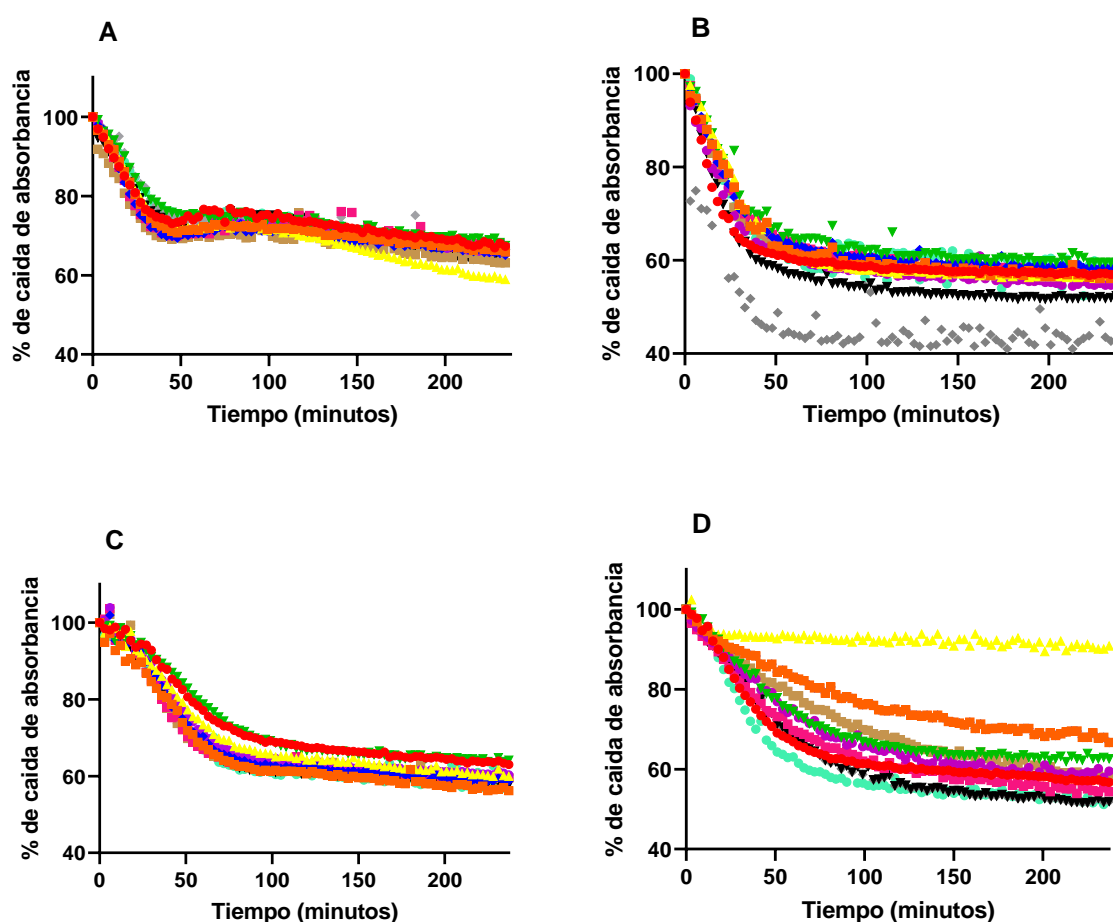


Figura IV: Germinación de los mutantes seleccionados WT (●), 35 (■), 36 (▲), 39 (▼), 40 (◆), 41 (●), 42 (■), 43 (■), 44 (▼), 45 (◆), 46 (●) con CN (A), L-alanina (B), AGFK (C) y CaDPA (D).

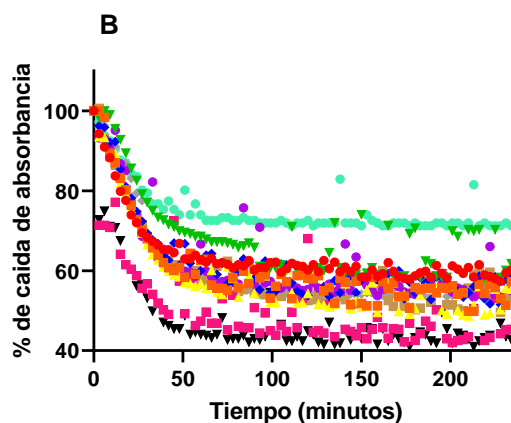
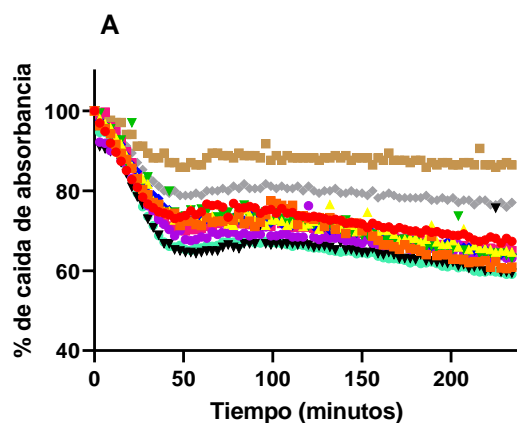
Tabla IV: Modelización de los mutantes seleccionados con CN, L-ala, AGFK y CaDPA según el hombro (X0), el Plateau y la pendiente (K).

CN	WT	35	36	39	40	41	42	43	44	45	46
X0	0	2,37	0	2,55	5,79	5,16	5,84	0	0	1,61	0
Plateau	71,27	69,2	62,5	70,97	68,86	69,45	70,72	67,38	68,65	68,61	68,73
K	0,04	0,04	0,01	0,03	0,06	0,05	0,07	0,04	0,02	0,02	0,02

L-ala	WT	35	36	39	40	41	42	43	44	45	46
X0	0,65	4,44	7,75	2,66	1,93	0	1,26	1,50	1,20	21	4,60
Plateau	57,85	57,46	56,71	60,37	59,29	56,25	58,29	57,42	52,66	43,96	59,25
K	0,05	0,03	0,04	0,03	0,04	0,03	0,03	0,03	0,04	0,15	0,05

AGFK	WT	35	36	39	40	41	42	43	44	45	46
X0	22,58	18,78	17,94	24,34	19,34	19	16,48	17,96	18,32	8,78	22,52
Plateau	64,08	57,81	61,12	64	59,74	61,12	60,31	60,81	59,01	38,72	59,4
K	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,03

CaDPA	WT	35	36	39	40	41	42	43	44	45	46
X0	10,22	4,15	0	9,65	9,80	0	6,30	3,16	0	9,41	10,03
Plateau	58,12	53,84	91,74	57,36	62,23	65,4	57,78	54,43	55,08	51,32	53,54
K	0,02	0,01	0,03	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03



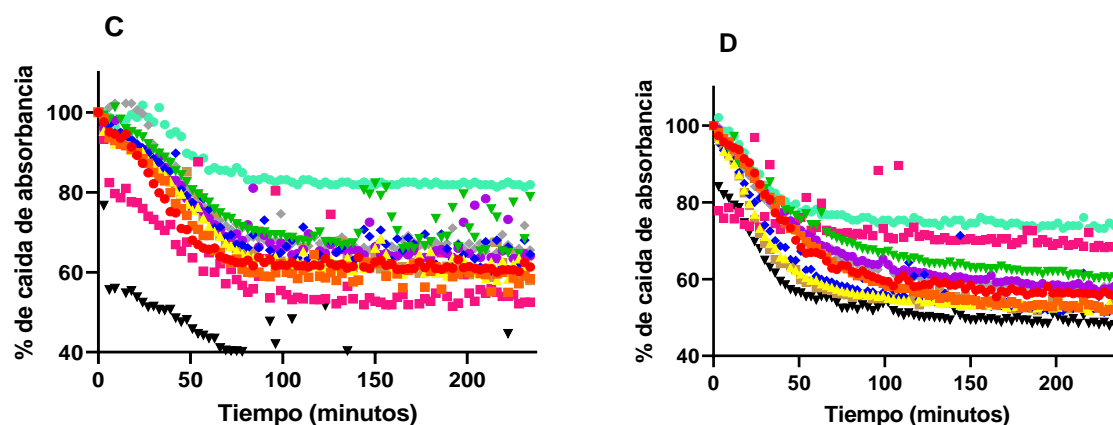


Figura V: Germinación de los mutantes seleccionados WT (●), 47 (■), 48 (▲), 49 (▼), 50 (◆), 51 (●), 52 (■), 53 (■), 54 (▼), 55 (◆), 56 (●) con CN (A), L-alanina (B), AGFK (C) y CaDPA (D).

Tabla V: Modelización de los mutantes seleccionados con CN, L-ala, AGFK y CaDPA según el hombro (X0), el Plateau y la pendiente (K).

CN	WT	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
X0	0	0	2,05	0,00002	0,68	4,51	8,46	15,44	13,03	2,39	2,54
Plateau	71,27	64,94	68,84	67,12	67,75	66,42	68,59	87,77	64,32	78,83	63,12
K	0,04	0,01	0,03	0,02	0,02	0,04	0,05	0,12	0,07	0,04	0,041

L-ala	WT	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
X0	0,37	4,47	5,25	9,45	5,54	8,87	0	2,78	21	11,23	3,04
Plateau	59,98	55,28	53,52	62,71	56,83	56,55	46,88	54,17	43,96	54,18	72,13
K	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,15	0,05	0,04

AGFK	WT	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
X0	18,4	24,74	27,17	27,56	27,44	24,82	0	24,88	8,78	22,48	55
Plateau	61,25	59,08	61,2	70,26	64,55	65,69	54,14	60,61	38,72	66,74	22,48
K	0,04	0,04	0,03	0,04	0,03	0,03	0,02	0,02	0,04	0,03	66,74

CaDPA	WT	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
X0	14,06	9,72	7,10	6,07	7,41	6,80	0	7,56	0	3,39	8,682
Plateau	56,55	52,07	53,22	60,56	53,91	58,04	68,46	53,65	49,46	57,24	74,42
K	0,02	0,02	0,03	0,01	0,03	0,02	0,01	0,04	0,03	0,02	0,042

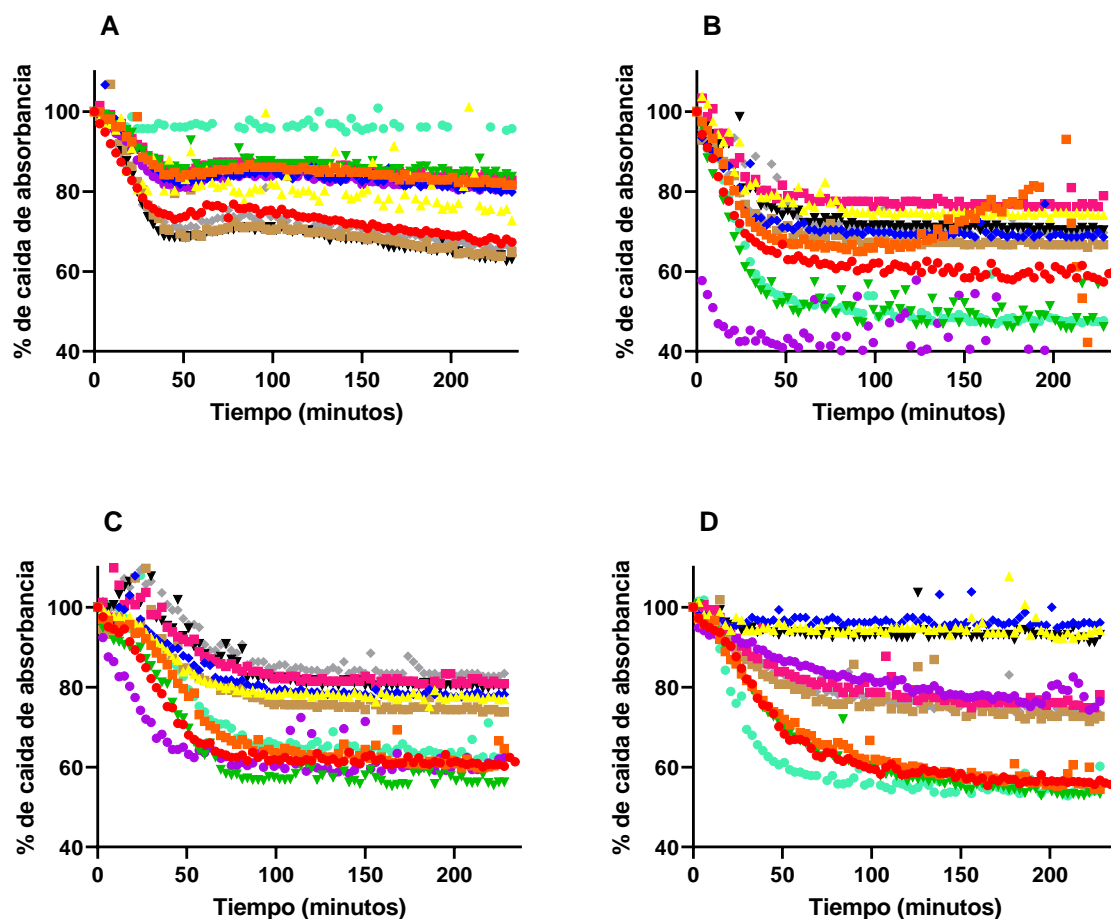


Figura VI : Germinación de los mutantes seleccionados WT (●), 57 (■), 58 (▲), 59 (▼), 60 (◆), 61 (●), 62 (■), 63 (■), 64 (▼), 65 (◆), 66 (●) con CN (A), L-alanina (B), AGFK (C) y CaDPA (D).

Tabla VI: Modelización de los mutantes seleccionados con CN, L-ala, AGFK y CaDPA según el hombro (X0), el Plateau y la pendiente (K).

CN	WT	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
X0	0	11,09	0	8,92	7,29	8,30	5,81	9,69	10,95	9,25	26,28
Plateau	71,27	84,15	78,68	86,2	82,79	82,45	85,11	68,93	67,52	70,4	23800
K	0,04	0,06	0,01	0,06	0,06	0,07	0,05	0,06	0,07	0,07	0

L-ala	WT	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
X0	0,37	236	5,66	3,85	0	20,32	8,71	7,28	10,67	41,19	7,99
Plateau	59,98	-2069	74,54	49,46	69,24	42,29	76,96	67,07	70,84	70,52	48,85
K	0,04	0,09	0,04	0,05	0,04	4189	0,05	0,04	0,04	0,11	0,04

AGFK	WT	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
X0	18,4	27,69	20,18	27,95	21	0	27,18	27	29,16	35,87	27,58
Plateau	61,25	61,75	77,36	57,09	77,9	61,09	81,22	74,63	80,21	83,6	63,83
K	0,04	0,03	0,03	0,04	0,03	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03

CaDPA	WT	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
X0	14,06	7,74	0	4,10	0	0	8,23	8,98	6	4,47	7,84
Plateau	56,55	56,27	91,94	53,29	88,22	76,06	76,06	74,24	93,25	74,22	55,19
K	0,02	0,02	0,003	0,02	0,0004	0,01	0,02	0,03	0,07	0,02	0,04

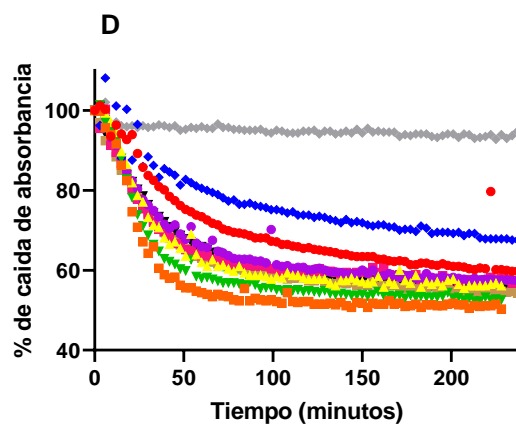
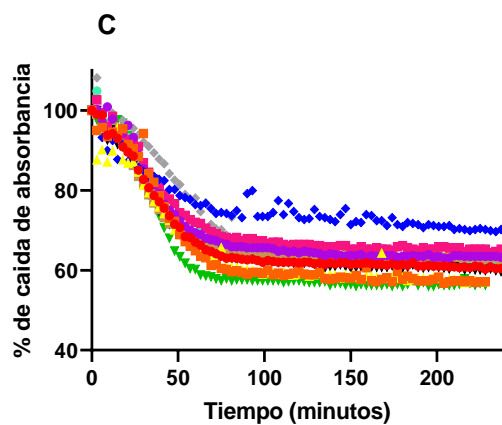
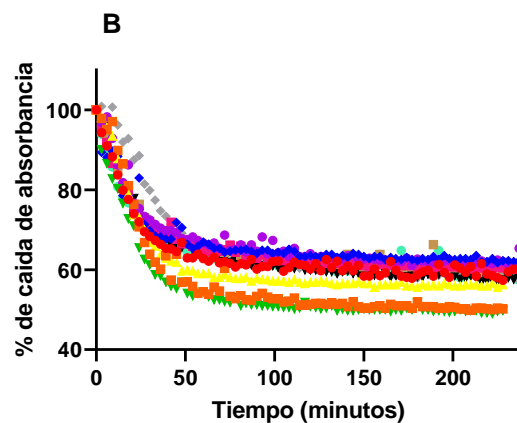
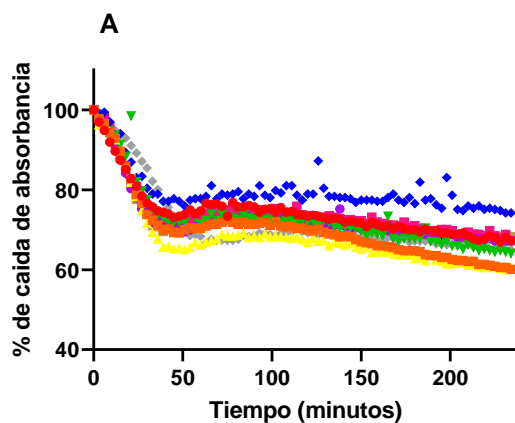


Figura VII : Germinación de los mutantes seleccionados WT (●), 67 (■), 68 (▲), 70 (▼), 71 (◆), 72 (●), 73 (■), 74 (■), 75 (▼), 76 (◆), 77 (●) con CN (A), L-alanina (B), AGFK (C) y CaDPA (D).

Tabla VII: Modelización de los mutantes seleccionados con CN, L-ala, AGFK y CaDPA según el hombro (X0), el Plateau y la pendiente (K).

CN	WT	67	68	70	71	72	73	74	75	76	77
X0	0	1,36	11,16	2,11	0	8,28	8,22	8,18	8,64	19,8	5,75
Plateau	71,27	65,89	64,87	68,52	-10,17	70,29	71,94	70,75	70,61	67,36	70,41
K	0,04	0,03	0,07	0,03	0,0005	0,08	0,07	0,09	0,089	0,06	0,06

L-ala	WT	67	68	70	71	72	73	74	75	76	77
X0	0	8,53	7,32	0	0	2,12	0	0,16	0,11	10,75	0,56
Plateau	59,26	51,25	56,53	50,04	63,09	62,88	61,35	61,7	58,86	59,26	60,89
K	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03	0,03	0,04

AGFK	WT	67	68	70	71	72	73	74	75	76	77
X0	15,88	26,44	21,36	22,7	0	19,98	18,34	15,7	9,91	25,26	16,13
Plateau	60,98	57,84	57,91	56,48	71,18	63,65	65,38	63,29	60,5	62,25	62,7
K	0,03	0,04	0,03	0,05	0,02	0,04	0,03	0,04	0,03	0,02	0,03

CaDPA	WT	67	68	70	71	72	73	74	75	76	77
X0	9,17	8,36	7,70	7,36	6	2,92	5,92	0,58	1,30	0	5,04
Plateau	61,56	51,56	57,06	53,92	68,35	58,45	58,66	55,44	56,12	94,09	56,47
K	0,02	0,05	0,03	0,04	0,01	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,03

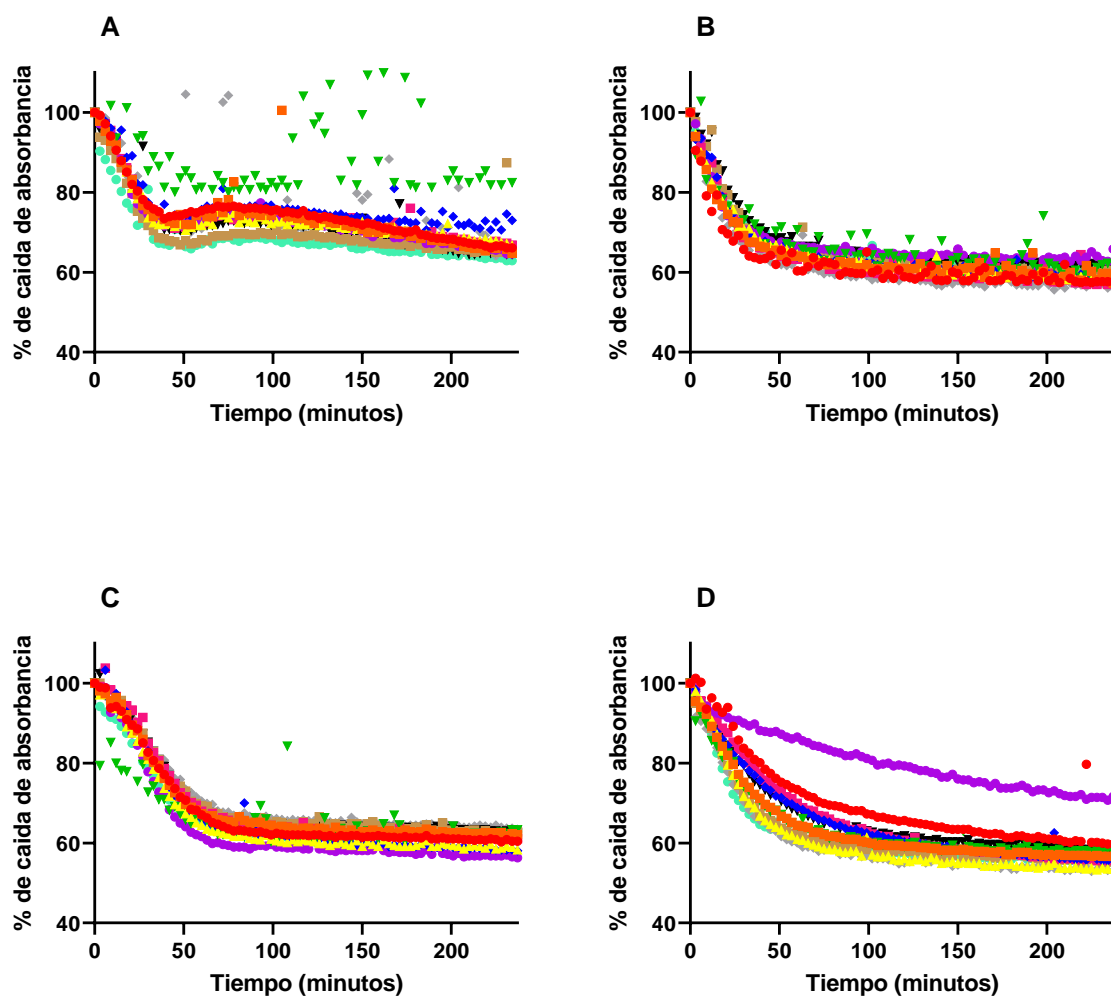


Figura VIII : Germinación de los mutantes seleccionados WT (●), 78 (■), 79 (▲), 80 (▼), 81 (◆), 82 (●), 83 (■), 84 (■), 85 (▼), 86 (◆), 87 (●) con CN (A), L-alanina (B), AGFK (C) y CaDPA (D).

Tabla VIII: Modelización de los mutantes seleccionados con CN, L-ala, AGFK y CaDPA según el hombro (X0), el Plateau y la pendiente (K).

CN	WT	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87
X0	1,48	0	5,52	116,8	11,45	2,84	7,98	7,91	1,17	0	0
Plateau	71,27	70,85	70,67	110,5	74,09	70,07	71,21	67,86	68,55	62,61	65,98
K	0,04	0,04	0,06	5,69	0,08	0,05	0,06	0,08	0,03	0,007	0,05

L-ala	WT	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87
X0	0	0	0	12	0,136	1,32	0,30	4,13	3,84	0	0
Plateau	59,26	60,49	59,64	62,75	60,12	64,04	59,21	60,94	62,57	57,59	62
K	0,05	0,04	0,03	0,05	0,03	0,05	0,04	0,04	0,03	0,04	0,04

AGFK	WT	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87
X0	15,88	14,22	13,45	5,99	12,41	15,72	18,93	16,69	19,2	15,04	15,74
Plateau	60,98	62,64	59,29	62,46	59,16	57,66	62,03	63,52	63,5	64,31	62,06
K	0,03	0,03	0,03	0,04	0,03	0,04	0,04	0,03	0,04	0,03	0,04

CaDPA	WT	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87
X0	9,17	3,44	4,58	3,44	0	0	2,06	4,096	3,32	0	2,56
Plateau	61,56	57,32	54,54	58,25	56,3	62,63	55,58	56,56	58,97	54,14	56,61
K	0,02	0,02	0,03	0,03	0,02	0,006	0,01	0,03	0,02	0,03	0,04

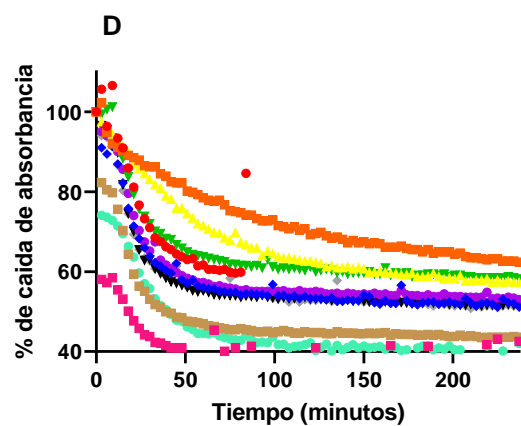
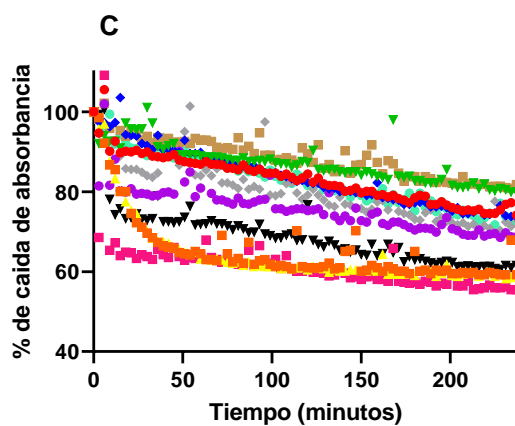
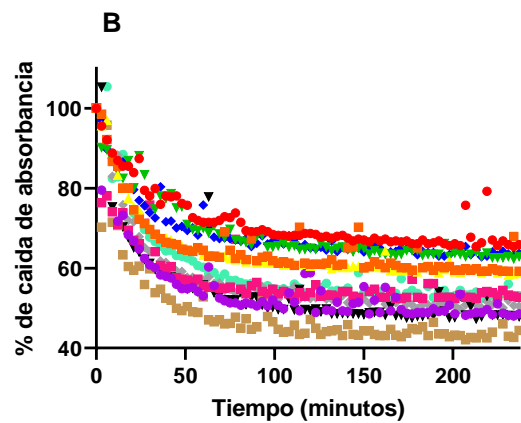
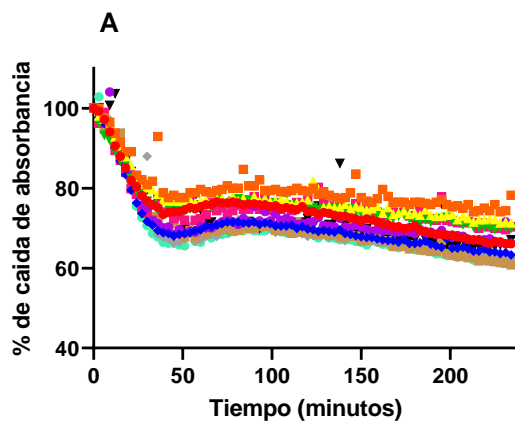


Figura IX : Germinación de los mutantes seleccionados WT (●), 88 (■), 89 (▲), 90 (▼), 91 (◆), 92 (●), 93 (■), 95 (■), 96 (▼), 97 (◆), 98 (●) con CN (A), L-alanina (B), AGFK (C) y CaDPA (D).

Tabla IX: Modelización de los mutantes seleccionados con CN, L-ala, AGFK y CaDPA según el hombro (X0), el Plateau y la pendiente (K).

CN	WT	88	89	90	91	92	93	95	96	97	98
X0	1,48	4,32	2,83	1,41	5,91	9,51	7,83	4,65	12	8,58	8,19
Plateau	71,27	77,61	74,66	73,66	67,81	69,86	73,89	66,28	69,64	66,66	66,21
K	0,04	0,04	0,04	0,05	0,06	0,08	0,11	0,04	0,08	0,06	0,08

L-ala	WT	88	89	90	91	92	93	95	96	97	98
X0	0	1,68	1,11	0	0	8,82	0	5,44	5,80	6	3
Plateau	67,03	61,54	60,16	63,12	64,47	51,18	53,67	44,67	50,69	51,96	54,28
K	0,02	0,05	0,04	0,02	0,03	0,08	0,03	0,05	0,08	0,05	0,05

AGFK	WT	88	89	90	91	92	93	95	96	97	98
X0	0	15,39	19,17	0	0	48	0	3,52	0	46,01	0
Plateau	66,69	65,08	64,66	72,11	63,52	66,5	59,53	72,31	62,47	68,49	65,96
K	0,005	0,03	0,03	0,004	0,005	0,009	0,06	0,004	0,01	0,01	0,005

CaDPA	WT	88	89	90	91	92	93	95	96	97	98
X0	86,2	0	0,93	8,14	7,84	8,27	0	0	8,07	2,42	0
Plateau	204	61,08	57,13	59,74	52,94	54,29	38,56	44,34	52,7	52,5	40,77
K	0,39	0,01	0,01	0,05	0,05	0,05	0,09	0,05	0,06	0,04	0,04

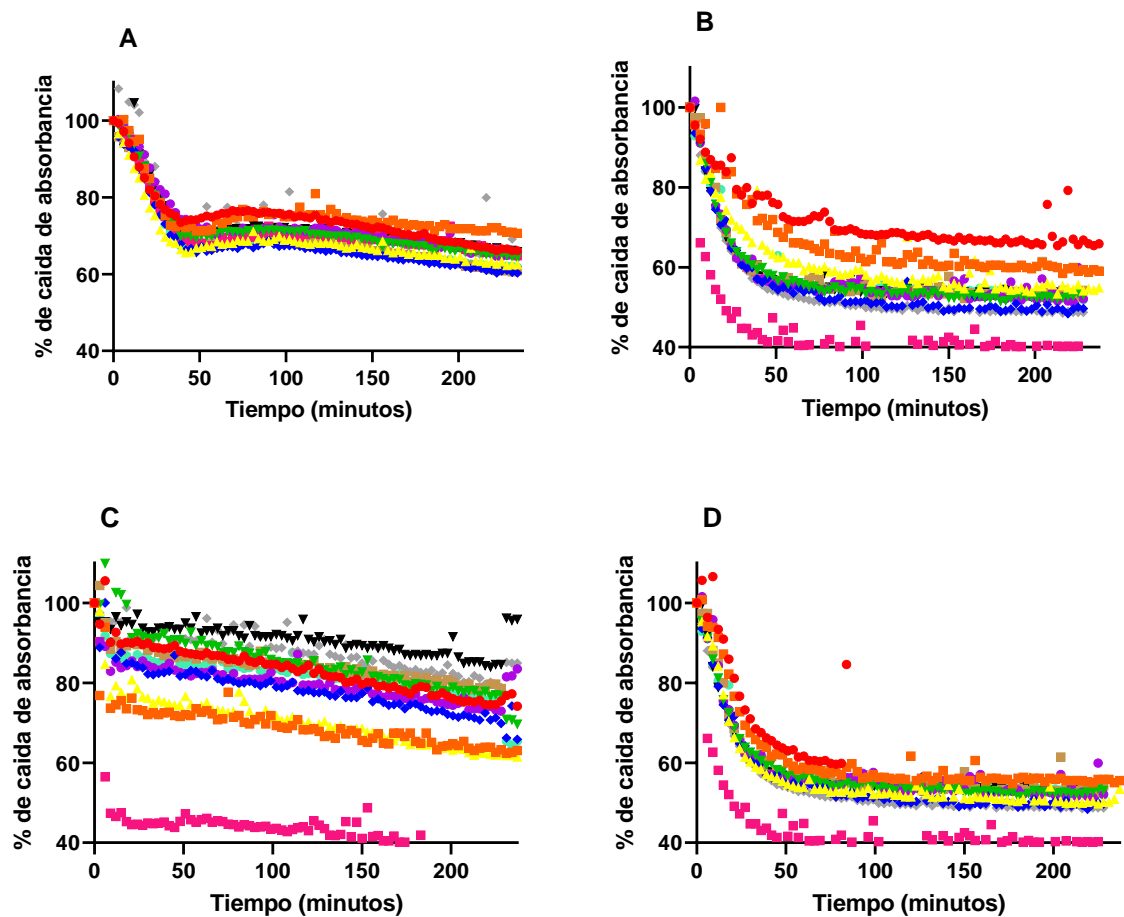


Figura X : Germinación de los mutantes seleccionados WT (●), 99 (■), 100 (▲), 101 (▼), 103 (◆), 104 (●), 105 (■), 106 (■), 107 (▼), 108 (◆), 109 (●) con CN (A), L-alanina (B), AGFK (C) y CaDPA (D).

Tabla X: Modelización de los mutantes seleccionados con CN, L-ala, AGFK y CaDPA según el hombro (X0), el Plateau y la pendiente (K).

CN	WT	99	100	101	103	104	105	106	107	108	109
X0	1,48	14,27	2,94	8,33	2,58	7,71	8,46	1,80	12	14,13	8,58
Plateau	71,27	73,5	66,13	68,28	64,03	68,96	68,62	65,18	69,64	69,83	65,6
K	0,04	0,14	0,06	0,05	0,04	0,04	0,07	0,03	0,07	0,09	0,06

L-ala	WT	99	100	101	103	104	105	106	107	108	109
X0	0	12	2,75	1,44	0,67	4,54	3	5,60	2,72	0,89	1,40
Plateau	67,03	60,38	56,35	53,17	50,3	53,92	41,15	54,12	53,74	49,53	53,9
K	0,02	0,03	0,04	0,05	0,04	0,06	0,14	0,06	0,06	0,05	0,05

AGFK	WT	99	100	101	103	104	105	106	107	108	109
X0	0	0	0	6	0	0	2,46	228	56,87	0	0
Plateau	66,69	63,32	58,27	71,71	55,71	70,98	42,17	132,2	86,4	51,03	40,1
K	0,005	0,01	0,007	0,008	0,003	0,006	0,36	119,4	0,01	0,001	0,0005

CaDPA	WT	99	100	101	103	104	105	106	107	108	109
X0	86,2	5,35	4,72	5,44	10,07	6,79	8,04	8,22	6,54	2,22	3
Plateau	204	56,08	51,65	52,58	51,49	56,39	51,34	58,32	59,52	51,74	54,41
K	0,39	0,04	0,06	0,06	0,03	0,03	0,04	0,06	0,06	0,05	0,05

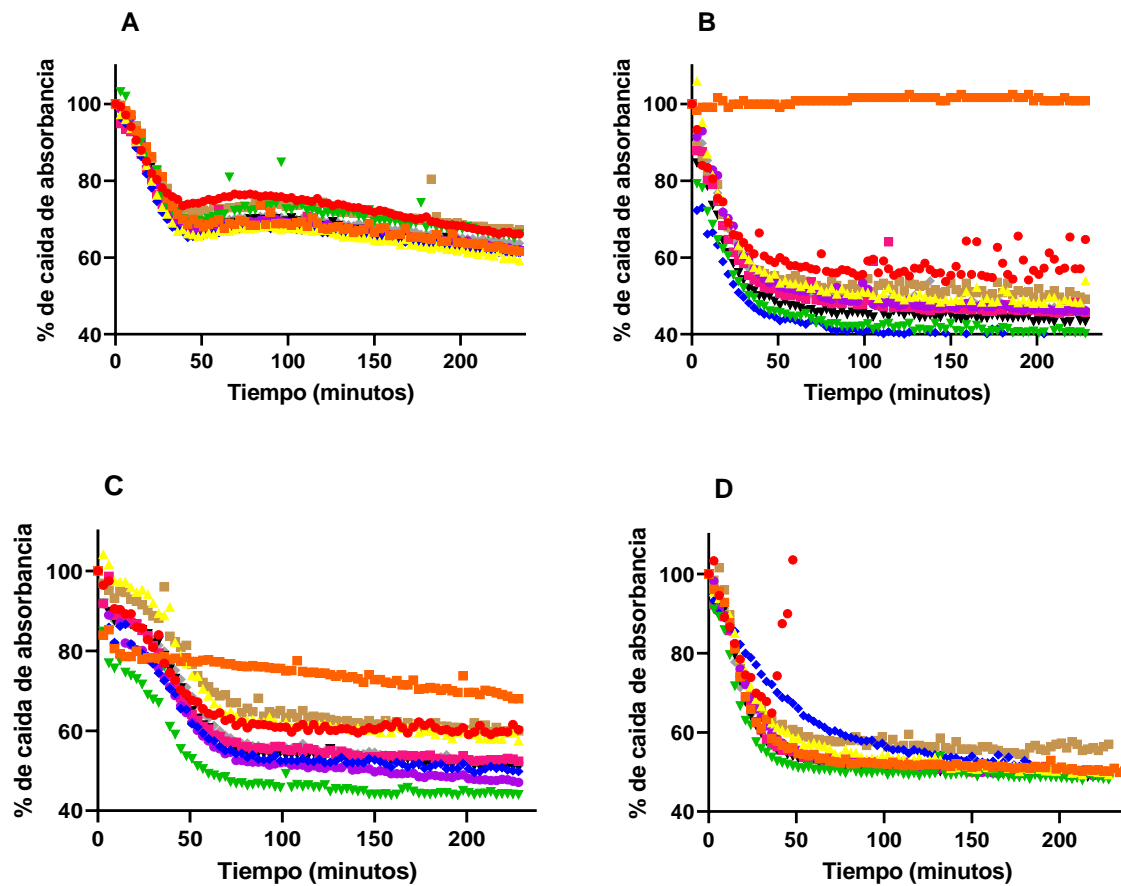


Figura XI: Germinación de los mutantes seleccionados WT (●), 110 (■), 111 (▲), 112 (▼), 113 (◆), 114 (●), 115 (■), 116 (■), 118 (▼), 119 (◆), con CN (A), L-alanina (B), AGFK (C) y CaDPA (D).

Tabla XI: Modelización de los mutantes seleccionados con CN, L-ala, AGFK y CaDPA según el hombro (X0), el Plateau y la pendiente (K).

CN	WT	110	111	112	113	114	115	116	118	119
X0	1,48	8,66	5,95	7,62	8,11	8,82	2,03	8,87	8,05	5,78
Plateau	71,27	66,2	64,19	70,31	64,95	66,32	65,27	71,11	65,97	67,19
K	0,04	0,05	0,05	0,08	0,07	0,06	0,04	0,06	0,05	0,04

L-ala	WT	110	111	112	113	114	115	116	118	119
X0	0,07	3,00	3	0	0	1,00	0	0	0	3,95
Plateau	57,46	101,6	49,66	41,52	40,21	47,35	47,23	51,45	44,7	48,04
K	0,06	0,01	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05

AGFK	WT	110	111	112	113	114	115	116	118	119
X0	18,17	224,9	26,77	18,22	21,16	21,48	21,79	29,1	25,81	24,49
Plateau	60,17	20,11	59,44	44,41	51,01	48,68	53,29	61,08	52,04	52,87
K	0,04	0,11	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,03	0,04	0,03

CaDPA	WT	110	111	112	113	114	115	116	118	119
X0	41	7,54	5,36	4,82	0	3,77	5,52	7,37	5,67	5,55
Plateau	251,1	51,47	51,37	49,35	50,7	50,3	50,8	56,63	50,26	50,95
K	0,05	0,06	0,04	0,07	0,02	0,04	0,05	0,06	0,06	0,06