



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

Recuperación celular de esporos de Bacillus tras el tratamiento térmico

Cellular recovery of Bacillus spores after heat treatment

Autor/es

Andrés Mata Calvete

Director/es

Mª Pilar Mañas Pérez y María Marcén Terraza

Facultad de Veterinaria

2017

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Tratamientos térmicos y cinética de inactivación microbiana.....	3
1.2 Termorresistencia de los grupos microbianos presentes en los alimentos	4
1.3 Ciclo vital estructura y características de los esporos bacterianos	6
1.4 Factores que influyen en la resistencia al calor de los esporos bacterianos.....	10
1.5 Concepto de daño subletal y recuperación celular tras el tratamiento térmico	13
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	15
3. METODOLOGÍA.....	16
3.1 Microorganismo	16
3.2 Medios de tratamiento y de recuperación	16
3.3 Determinación de las concentraciones máximas no inhibitorias (CMNI) para glutatión, cisteína y NaCl.....	16
3.4 Determinación de la resistencia al calor. Termorresistómetro.....	17
3.5 Construcción de curvas de supervivencia y modelización matemática	18
3.6 Cálculo de los parámetros de resistencia y análisis estadístico	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4.1 Termorresistencia de <i>B. subtilis</i> en tampón de pH 7,0	20
4.2 Termorresistencia de <i>B. subtilis</i> en tampón de pH 4,0	24
4.3 Daño celular	28
4.3.1 Determinación de condiciones de recuperación	28
4.3.2 Reparación celular de esporos tras el tratamiento térmico en medios de pH 7,0 y pH 4,0	30
4.3.3 Reparación celular de esporos tras el tratamiento térmico en alimentos....	32
5. CONCLUSIONES.....	35
CONCLUSIONS	36
6. APORTACIONES EN MATERIA DE APRENDIZAJE	37
7. BIBLIOGRAFÍA	38

RESUMEN

La industria alimentaria opta frecuentemente por los tratamientos térmicos para garantizar la estabilidad e inocuidad microbiológica de los alimentos. En los alimentos, se pueden encontrar diversos grupos microbianos con distinta termorresistencia, en algunos casos muy elevada, como la de los esporos bacterianos. La termorresistencia de estos depende de muchos factores, como por ejemplo el pH del medio de tratamiento. Por otro lado, los tratamientos térmicos pueden causar daños a distintos niveles celulares, provocando lesiones letales o subletales. Los microorganismos dañados subletalmente pueden reparar sus lesiones y sobrevivir si las condiciones de tratamiento son adecuadas, de ahí la importancia de diseñar un tratamiento térmico adecuado, que tenga en cuenta estos aspectos fisiológicos.

En este trabajo se ha caracterizado la resistencia al calor de los esporos de *Bacillus subtilis* y su capacidad de recuperación tras el tratamiento térmico. Se han estudiado algunos aspectos como la cinética de inactivación en esporos tratados térmicamente en medios de distinto pH, y la presencia de fenómenos de daño subletal y reparación. Tras realizar el estudio en tampones de pH 7,0 y pH 4,0, se realizaron experimentos en leche entera y en zumo de naranja, ya que tienen un pH similar a los tampones utilizados, y así obtener una visión más práctica directamente en alimentos.

Los resultados obtenidos en esta investigación mostraron que el pH del medio de tratamiento determina la termorresistencia, la cinética de inactivación y la recuperación de *B. subtilis*, tanto en tampón como en los alimentos utilizados. Además, se observó que los esporos tratados a pH 7,0 se recuperan mejor tras el tratamiento térmico en un medio mínimo, en comparación a un medio complejo.

ABSTRACT

The food industry frequently chooses heat treatments to ensure stability and microbiological food safety. Various microbial groups with different thermal resistance can be found in food, , in some cases very high, as bacterial spores. The thermal resistance of these depends on many factors, such as for example the pH of the menstruum; on the other hand heat treatments can cause damage at different cellular levels, causing lethal or sublethal injury. The microorganisms with sublethal damage can repair their injuries and survive if the recovery conditions are suitable, hence the importance of designing an appropriate heat treatment, that takes into account these physiological aspects.

In this his work, the heat resistance of *Bacillus subtilis* spores, and their recovery capacity after heat treatment has been characterized. We have studied some aspects such as the kinetics of inactivation in spores heat-treated in media of different pH, and the presence of sublethal damage and cellular repair. After performing the study in buffers of pH 7,0 and pH 4,0, experiments were carried out in whole milk and orange juice, because they have a pH similar to the buffers used, in order to obtain a more practical vision in food.

The results obtained in this research showed that the pH of the menstruum determines the thermal resistance, the kinetic of inactivation and cell recovery of *B. subtilis* in food and buffer. In addition, it was observed that the spores treated in pH 7,0 recover better after heat treatment in minimal medium than in complex medium.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Tratamientos térmicos y cinética de inactivación microbiana.

El tratamiento térmico continúa siendo la herramienta más habitualmente utilizada por la industria alimentaria para garantizar la salubridad de los alimentos y prolongar su vida útil, ya que presenta la ventaja frente a otros métodos de que es capaz de inactivar los microorganismos y enzimas presentes en el alimento.

Los tratamientos térmicos utilizados en la industria alimentaria se podrían agrupar en dos grandes grupos, dependiendo de su intensidad y del objetivo que persiguen. De esta manera podemos hablar de tratamientos de pasteurización y esterilización. Con los tratamientos de pasteurización se pretende inactivar a los patógenos vegetativos presentes en el medio, consiguiendo así garantizar la salubridad y alargar la vida útil del producto, siempre que éstos se mantengan en refrigeración. En estos tratamientos se emplean temperaturas inferiores a 100°C, pudiendo optarse entre un tratamiento a baja temperatura y prolongado en el tiempo (LT LT) o por tratamientos cortos a elevadas temperaturas (HTST). Dependiendo del tratamiento aplicado se consigue distinto grado de inactivación microbiana y enzimática. En cuanto a los tratamientos de esterilización, persiguen garantizar la estabilidad del producto a temperatura ambiente, por ello se utilizan temperaturas de tratamiento elevadas que además de inactivar las formas vegetativas, son capaces de inactivar hasta cierto nivel las formas esporuladas. En este tipo de tratamiento también encontramos diferencias en las combinaciones de tiempo y temperatura de tratamiento, que difieren en el grado de inactivación microbiana y enzimática, y de alteración de la calidad del producto.

En los tratamientos térmicos son el tiempo y la temperatura los dos parámetros a controlar. Por lo que respecta a la inactivación de los microorganismos, de manera general se asume que, a una temperatura constante, existe una relación exponencial entre el número de células supervivientes al calor y el tiempo de tratamiento (Casp y Abril, 2003). Con el fin de diseñar nuevos tratamientos y poder hacer comparaciones entre diferentes especies, condiciones o tratamientos la termorresistencia microbiana suele expresarse con el valor D_t , o tiempo de reducción decimal, que se define como el tiempo en minutos a una temperatura determinada necesario para reducir la población microbiana un ciclo logarítmico. El valor D_t se corresponde con el inverso negativo de

la pendiente de la gráfica de supervivencia, gráfica que se construye representando el logaritmo decimal del número de supervivientes frente al tiempo de tratamiento a temperatura constante (Casp y Abril, 2003).

La misma relación existe entre el valor D_t y la temperatura de tratamiento. Así, el valor z se define como número de grados que hay que incrementar la temperatura para reducir un ciclo logarítmico el valor D_{t_0} , y se calcula a partir de la inversa negativa de la pendiente de la recta de termodestrucción, que representa el logaritmo del valor D_t frente a la temperatura de tratamiento. Ambos parámetros nos permiten definir la termorresistencia no sólo de microorganismos sino también de enzimas o componentes de los alimentos, cuya cinética de inactivación se ha demostrado similar (Casp y Abril, 2003).

No obstante es importante tener en cuenta que, aunque el uso de los valores D_t y z es habitual, y se ha demostrado útil para el establecimiento de los tratamientos térmicos a aplicar en diferentes alimentos, hoy en día es un hecho que no siempre se observa una relación exponencial entre el número de microorganismos supervivientes y al tiempo de tratamiento. Es frecuente la aparición de fenómenos de desviación de la linealidad, en forma de fenómenos de hombro y cola (Palop, 1995), al principio y al final de la curva de supervivencia, respectivamente, que se corresponden con porciones de la curva en las que el recuento microbiano no disminuye a la misma velocidad. Hoy en día existen modelos matemáticos capaces de describir estas desviaciones, y herramientas informáticas que permiten su utilización de manera sencilla (Cebrián, 2009).

1.2 Termorresistencia de los grupos microbianos presentes en los alimentos.

La termorresistencia de los distintos grupos microbianos varía muy ampliamente en la naturaleza. Estas diferencias se deben a la existencia de especies microbianas con estructuras muy diferenciadas y diferentes mecanismos de resistencia e inactivación, como es el caso de las células vegetativas y los esporos. En la Tabla 1.1 se muestra distintos valores de D_t y z de distintas especies microbianas.

Se considera que las células vegetativas de las levaduras son menos resistentes que las bacterianas, existiendo siempre excepciones. En cualquier caso, tanto las levaduras como los mohos presentan una termorresistencia muy variable. Algunas

especies de mohos también son capaces, al igual que las células bacterianas, de generar formas de mayor termorresistencia, que pueden presentar tiempos de reducción decimal incluso semejantes a las de algunos esporos bacterianos (Cebrián, 2009).

La termorresistencia en células vegetativas también es muy variable. Comparando los dos grupos bacterianos tradicionales se afirma que las Gram-positivas son, en general, más resistentes que las Gram-negativas, y dentro de las primeras más las formas cocoides que las bacilares. Por último, además de las diferencias entre géneros, también se observan diferencias dentro del mismo género llegando incluso a haber diferencias dentro de la misma especie (Cebrián, 2009).

En cuanto a los esporos bacterianos, constituyen las formas de mayor termorresistencia, de manera que son capaces de resistir a la mayoría de tratamientos de pasteurización e incluso muchos de esterilización. Los tiempos de reducción decimal de los esporos son en muchas ocasiones superiores a 1 minuto a 100°C y, en ocasiones, incluso a 121°C. En general se admite que los esporos del género *Bacillus* son más resistentes que los del género *Clostridium* (Stumbo, 1965).

Por ello los esporos van a ser agentes de alteración muy importantes en los alimentos, y su inactivación y/o control es objetivo prioritario de la industria alimentaria.

Tabla 1.1: Valores D_{62} (células vegetativas y levaduras), D_{102} (esporos) y z de diferentes especies microbianas en fase estacionaria (células vegetativas) o fase de esporo en tampón McIlvaine de pH 7,0. Temperatura de crecimiento: 37°C (células vegetativas) y 28°C (levaduras). Temperatura de esporulación: 35°C (esporos) (Adaptado de Cebrián, 2009).

		D_t (minutos)	z (°C)
Vegetativas y levaduras	<i>Aeromonas hydrophila</i> ^a	0,01 ^b	5,8
	<i>Listeria monocytogenes</i>	0,34	5,8
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	0,17	5,1
	<i>Enterococcus faecium</i>	7,10	6,0
	<i>Salmonella typhimurium</i>	0,08 ^b	4,6
	<i>Salmonella enteritidis</i>	0,04	5,0
	<i>Salmonella senftenberg</i>	0,40	5,0
Esporos	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 173	0,24	3,85
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 325	0,03	3,33
	<i>Bacillus subtilis</i>	1,70	9,2
	<i>Bacillus licheniformis</i>	2,20	6,8
	<i>Bacillus coagulans</i>	1,30	8,6

^a: Temperatura de crecimiento: 35° ^b: D_{61}

1.3 Ciclo vital estructura y características de los esporos bacterianos.

El ciclo biológico de los esporulados comprende por un lado, el crecimiento vegetativo (similar al resto de especies bacterianas) y por otro lado los procesos de esporulación y germinación (Figura 1.1). En el caso de que la célula encontrara las condiciones adecuadas para su desarrollo se produce el crecimiento vegetativo. Cuando se detecta una deficiencia nutricional en el medio se activa el proceso de esporulación, que conduce a la formación de un esporo, mucho más resistente que la célula normal a las condiciones adversas del medio, pudiendo germinar cuando encuentre las condiciones óptimas y transformarse en una nueva célula vegetativa (Palop, 1995).

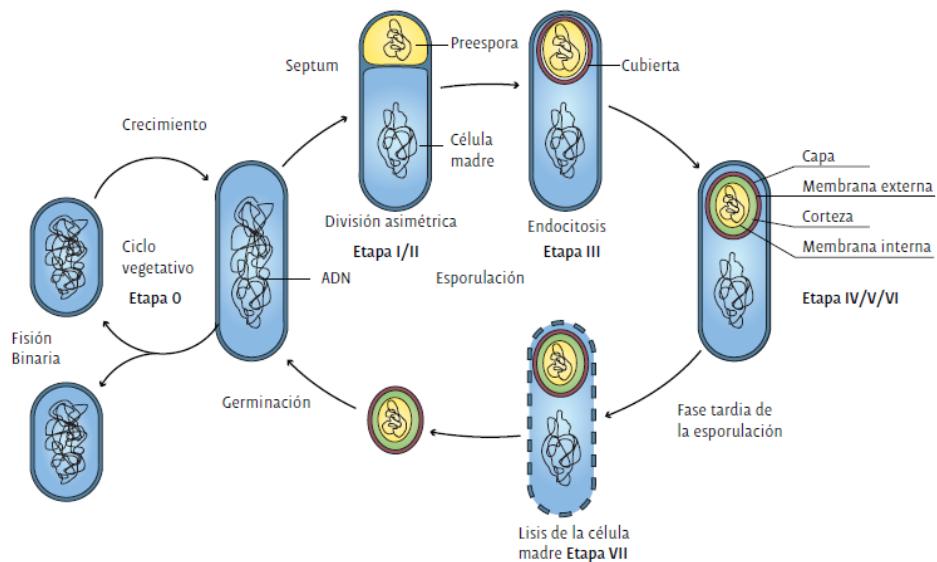


Figura 1.1. Esquema del ciclo vital de los esporulados (Adaptado de Huesca-Espitia *et al.*, 2014)

El proceso de esporulación se divide en siete etapas (Figura 1.1). Un crecimiento celular vegetativo normal se puede definir como fase cero con respecto a la esporulación, y es seguida por las etapas I/II, donde la célula vegetativa inicia la división celular asimétrica y la formación de dos compartimentos separados, siendo denominado el más pequeño preesporo. Durante la etapa III, el preesporo es endocitado por la célula madre para formar una célula distinta rodeada por las membranas interior y exterior. En la etapa IV se lleva a cabo la síntesis de la corteza del esporo, compuesta por peptidoglicano, entre las membranas interior y exterior del preesporo, y es seguida de la etapa V durante la cual se lleva a cabo la formación de la capa del esporo. Durante las etapas IV a VI, la célula madre también sintetiza una molécula específica del esporo que es muy abundante, ácido piridina-2,6 - dicarboxílico (ácido dipicolínico, DPA). Esta se acumula en el preesporo, produciéndose también simultáneamente una reducción de su contenido de agua. La maduración del esporo se lleva a cabo durante esta etapa, y se caracteriza porque el material de la capa externa del esporo se vuelve más denso. En la etapa final (VII) se produce la lisis de la célula madre y la liberación del esporo maduro. La estructura del esporo maduro protege a los microorganismos inactivos de las condiciones desfavorables externas hasta que, una vez más, se vuelven favorables para el

crecimiento celular vegetativo. El esporo latente es entonces reactivado y se produce la germinación y el crecimiento vegetativo (Huesca-Espitia *et al.*, 2014).

La transición de esporo a célula vegetativa implica tres fases distintas: la activación, la germinación y el crecimiento. La activación puede ser provocada por condiciones de calor, el pH o la exposición a sustancias químicas y hace que el esporo entre en el proceso de germinación, por lo tanto rompe su estado de latencia. La activación es un proceso reversible que no necesariamente compromete al esporo en seguir con la germinación y el crecimiento, de tal forma que los esporos activados conservan la mayoría de las propiedades que poseen los latentes. En contraste, una vez que los esporos inician la germinación ya no pueden volver a su estado inactivo. La germinación puede iniciarse en respuesta a diversos estímulos, que varían dependiendo de la especie. Estos incluyen, pero no están limitados, a nutrientes metabolizables, tales como aminoácidos y azúcares específicos. También algunas especies iónicas, tensoactivos catiónicos y quelatos (en particular Ca^{+2} y DPA) y algunos tratamientos físicos tales como altas presiones (Setlow, 2008).

El crecimiento se define como todos los eventos de desarrollo que tienen lugar después de la germinación, incluyendo la iniciación del metabolismo y síntesis macromolecular (hinchamiento del esporo), la emergencia (donde se desprenden las capas exteriores de los esporos) y el crecimiento de la nueva célula. Todo esto representa un retorno del esporo al crecimiento de las células vegetativas (Huesca-Espitia *et al.*, 2014).

La estructura del esporo y la composición química juegan un papel importante en su resistencia. Como no es sorprendente, el esporo tiene una estructura muy diferente a la de una célula en crecimiento, con una serie de características y constituyentes únicos (Figura 1.2).

Empezando por el exterior y siguiendo hacia el interior, en un esporo bacteriano se encuentra el exosporio, las capas externa e interna, cubierta, membrana externa, córtex, membrana interna y núcleo o “core”.

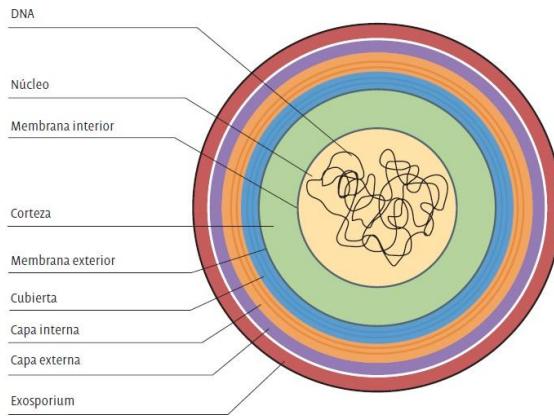


Figura 1.2. Estructura morfológica del esporo (Adaptado de Huesca-Espitia et al., 2014).

El exosporio, que aparece solo en algunas especies, las capas externa e interna y la cubierta son estructuras de naturaleza proteica (Huesca-Espitia *et al.*, 2014). La cubierta parece desempeñar un papel importante en la resistencia de los esporos frente a algunos productos químicos, a las enzimas líticas exógenas que pueden degradar el córtex de los esporos y a la depredación por protozoos, pero tiene poco o ningún papel en la resistencia de los esporos al calor, a la radiación u otros productos químicos (Setlow, 2006).

La función precisa de la membrana externa, que se encuentra bajo la cubierta del esporo, no está clara, aunque esta membrana es una estructura esencial en la formación de los esporos. De hecho, la eliminación de la membrana exterior, así como de proteínas de la cubierta de la esporo, no tiene ningún efecto notable sobre la resistencia de los esporos al calor, la radiación y algunos productos químicos (Huesca-Espitia *et al.*, 2014.; Setlow, 2000).

La corteza, o córtex, se compone de peptidoglicano con una estructura similar a la de la célula vegetativa, pero con varias modificaciones específicas del esporo. La corteza es esencial para la formación de un esporo latente y para la reducción del contenido de agua de su núcleo. Sin embargo, el mecanismo por el que la corteza del esporo logra esta última protección no se conoce aún. Bajo el córtex encontramos la membrana interior, que en contraste con la membrana externa del esporo, es una barrera contra la permeabilidad y desempeña un papel importante en la resistencia del esporo a muchos productos químicos, en particular, los que cruzan esta membrana

para dañar al ADN. Dicha membrana interior está formada por moléculas de lípidos (Huesca-Espitia et al., 2014.; Setlow, 2006).

La parte más interna del esporo es el protoplasto o “core”. El protoplasto contiene la mayor parte de las enzimas del esporo, así como ADN, ribosomas y ARNt. En casi todos los casos, las enzimas del esporo y los ácidos nucleicos son idénticos a los de las células en crecimiento, aunque hay algunas macromoléculas únicas en el núcleo. También hay tres pequeñas moléculas cuyos niveles en el protoplasto son importantes en la resistencia de los esporos. La primera es el agua, la cual es solo el 27-55 % del peso húmedo del núcleo del esporo, dependiendo de la especie. La cantidad de agua libre en el protoplasto del esporo es extremadamente baja, de tal forma que el movimiento macromolecular está muy restringido y es probablemente el factor más importante en la latencia enzimática del esporo, así como también determina la resistencia de la espora ante el calor húmedo.

La segunda molécula es ácido dipicolínico (DPA). Esta molécula comprende el 5-15 % del peso seco del esporo en las especies de *Bacillus* y *Clostridium* y se encuentra solo en el núcleo, donde se encuentra quelando cationes divalentes, en gran parte Ca^{2+} (Huesca-Espitia et al., 2014).

El tercer tipo de molécula es un grupo de proteínas pequeñas solubles en ácido (SASP). Estas proteínas se asocian con el ADN de los esporos, protegiéndolo frente a diversos tipos de daños (Setlow, 2006). Diversos estudios han demostrado que las SASP de los tipos α y β son factores importantes en la resistencia de los esporos ante varios agentes, incluyendo la radiación UV, formaldehido, ácido nitroso y el calor seco y, además, contribuyen significativamente a la resistencia de los esporos al calor húmedo y al peróxido de hidrógeno, así como a la osmorresistencia (Setlow, 2000). Además, todas las SASP juegan un papel en el inicio del crecimiento de los esporos ya que proporcionan aminoácidos por su degradación temprana durante la germinación, que el esporo utiliza en su metabolismo y síntesis de proteínas (Setlow, 2006).

1.4 Factores que influyen en la resistencia al calor de los esporos bacterianos.

Es importante conocer los factores que influyen en la termorresistencia de los esporos bacterianos, ya que juegan un papel muy importante en la industria alimentaria. Conociendo estos factores se pueden realizar mejoras en los métodos de

inactivación de los esporos. Los factores determinantes de la termorresistencia se podrían clasificar, según en el momento en el que actúan en:

- Previos al tratamiento térmico.
- Simultáneos al tratamiento térmico.
- Posteriores al tratamiento térmico

Los factores previos al tratamiento térmico influyen durante la esporulación. Determinan características esenciales para la termorresistencia del esporo, como el grado de deshidratación de su protoplasto o su composición en minerales. Los más importantes son la temperatura de esporulación y la naturaleza del medio en la que ésta se verifica (Palop, 1995).

La temperatura de esporulación es uno de los factores que en mayor medida determinan la termorresistencia. En general se asume que temperaturas de esporulación mayores conducen a la obtención de cosechas de esporos más termorresistentes (Palop, 1995).

En cuanto a la composición del medio de esporulación, los factores que más afectan a la termorresistencia son el pH, el contenido en calcio y la concentración de fosfatos. El pH óptimo para la esporulación es similar al del crecimiento pero con un rango más reducido. La concentración de minerales determina el grado de mineralización del esporo, que a su vez, determinará la termorresistencia. Por ello el aumentar la concentración de calcio, que afecta al contenido de DPA, aumenta notablemente la termorresistencia. Los fosfatos sin embargo actúan en sentido contrario, reduciendo la termorresistencia (Palop, 1995).

Los factores simultáneos al tratamiento térmico incluyen las características al medio de calentamiento, así como la posible acción de agentes físicos durante el mismo. Las características más importantes del medio son su actividad de agua, su pH su fuerza iónica y su composición.

La actividad de agua (a_w) es el factor que más influencia la termorresistencia microbiana. Los valores D_t pueden aumentar, incluso miles de veces, al reducirse la a_w del medio hasta valores de 0,2-0,4 (Palop, 1995). Los factores físicos que parecen tener un mayor efecto aplicados simultáneamente con el calor son las altas presiones y

los ultrasonidos. Ambos reducen la termorresistencia del microorganismo al aplicarse junto al calor.

Los factores posteriores al tratamiento térmico se refieren a las condiciones de recuperación de las células supervivientes. No influyen en la termorresistencia real, sino que están relacionados con la reparación del daño causado por el calor en las células que ya han superado el tratamiento térmico (ver sección 1.5).

Efecto del pH.

La influencia del pH en el medio de calentamiento ha sido ampliamente estudiada por su importancia práctica, ya que es frecuente acidificar las conservas de manera previa al tratamiento de esterilización, con objeto de aumentar la eficacia letal del tratamiento térmico sobre los esporos bacterianos. Por lo general, la termorresistencia máxima se presenta a pH neutro, y se reduce al alejarse de la neutralidad. La magnitud del efecto del pH varía mucho, incluso entre cepas, quizás estas diferencias se deban a la influencia de factores no controlados tales como la temperatura de esporulación.

También existe controversia sobre la influencia del pH en el valor z . Mientras que para unos autores el valor z no se modifica por el pH, otros encuentran que el valor z disminuye con la acidificación y otros que aumenta, de forma que a temperaturas elevadas puede dejar incluso de ejercer efecto. De acuerdo con Palop *et al.* (1998) los esporos son menos resistentes en todos los medios de tratamiento a pH ácido. Sin embargo la magnitud del efecto del pH depende de la temperatura de tratamiento, siendo mayor a temperaturas bajas. La temperatura de esporulación podría estar igualmente implicada en la influencia del pH sobre el valor z (Palop, 1995).

Al margen del posible mecanismo de acción del pH, sus ventajosos efectos han sido aprovechados ampliamente por la industria alimentaria, no solo por la reducción de la termorresistencia microbiana, sino también por la inhibición de la germinación de los esporos a pHs ácidos. La acidificación permite aplicar unos tratamientos más suaves a los alimentos, lo cual repercute en su calidad organoléptica y nutritiva (Palop, 1995).

1.5 Concepto de daño subletal y recuperación celular tras el tratamiento térmico.

La muerte de los microorganismos puede definirse como una pérdida irreversible de la capacidad de multiplicación. Sin embargo, los microorganismos que sobreviven a los tratamientos pueden presentar lesiones, las cuales, en condiciones adecuadas pueden ser reparadas de tal manera que los microorganismos sean capaces de seguir multiplicándose (Mackey, 2002). Aunque los fenómenos de daño subletal y recuperación celular tras el tratamiento térmico se han estudiado con mayor detalle en células vegetativas, también existen en esporos.

Los síntomas típicos de la lesión de los esporos incluyen aceleración de la germinación, alteración de las necesidades nutricionales, sensibilidad a la recuperación en diferentes medios, alteración de la temperatura óptima de crecimiento, mejor recuperación en presencia de almidón o carbón activo, recuperación altamente influenciada por el gas de la atmósfera o por el potencial redox, sensibilidad al cloruro de sodio y otros conservantes de alimentos y antibióticos. Los esporos lesionados se asemejan así a las células vegetativas afectadas por el tratamiento térmico, al ser más exigentes en sus condiciones de crecimiento que los no lesionados (Mackey, 2002).

Sin embargo, algunas lesiones son únicas para los esporos. Además, el estado de deshidratación del protoplasto puede afectar la conformación de macromoléculas y, por tanto, al daño causado. Otra diferencia es que los esporos son metabólicamente inactivos, y la lesión subletal es sólo detectable durante la germinación o la proliferación (Mackey, 2002).

Desafortunadamente, no es posible hacer recomendaciones generales para todos los tipos de lesiones causadas por el tratamiento térmico sobre los esporos bacterianos, ya que dependerá del microorganismo tratado. Para la recuperación máxima de esporos severamente dañados, pueden ser necesarios algunos aditivos tales como sangre, carbón activo o almidón para neutralizar trazas de inhibidores presentes en el medio. En general, los medios preparados con infusiones frescas han demostrado ser mejores que los hechos con ingredientes deshidratados. Los esporos lesionados parecen particularmente sensibles al gas de la atmósfera y/o al potencial redox, pero las interacciones entre el gas atmosférico y el agente reductor pueden ser complejas y

en algunos casos, el incubar anaerobiamente puede dar mejores resultados (Mackey, 2002).

La temperatura óptima y el pH para la recuperación de los esporos dañados pueden diferir de la óptima de crecimiento, pero hay marcadas diferencias dependiendo de la especie o cepa de organismo y la naturaleza y severidad del tratamiento dado.

Debido a que los tiempos de germinación varían dentro de las poblaciones de esporos dañados, la probabilidad aparente de supervivencia dependerá del tiempo de incubación de los medios de recuperación. De forma similar, la probabilidad de crecimiento en un producto dependerá no sólo de la supervivencia de los esporos sino también del tiempo de almacenamiento. Por ejemplo, el deterioro de los productos alimenticios por esporos anaerobios termófilos puede ocurrir a veces incluso después de varios meses (Mackey, 2002).

De ahí la importancia de conocer tanto el daño subletal en los microorganismos tratados por calor, como la capacidad de reparación y crecimiento que presentan en los distintos grupos de alimentos.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La conservación de los alimentos por el calor, pese a ser ampliamente utilizada por la industria alimentaria, presenta algunas cuestiones no resueltas. Todavía no se conocen con profundidad aspectos de la fisiología microbiana que determinan la termorresistencia, la cinética de inactivación frente al calor y su descripción mediante modelos matemáticos adecuados, o los fenómenos de daño subletal y recuperación celular. Aunque en los últimos años se han realizado avances importantes, estos se han llevado a cabo especialmente con células vegetativas, pese a ser los esporos bacterianos mucho más resistentes al calor, y por ello, muy importantes en un gran número de alimentos.

El objetivo de este trabajo fue aportar conocimientos acerca de la fisiología de la inactivación de los esporos por el calor, tomando como modelo al esporulado aerobio *Bacillus subtilis*. Se establecieron los siguientes objetivos parciales:

- Caracterizar la inactivación de *B. subtilis* por calor en un medio de tratamiento modelo, tampón de pH neutro, y describirla mediante un modelo matemático adecuado.
- Comparar la inactivación en medio neutro con la obtenida en medio ácido.
- Explorar la posible presencia de fenómenos de daño subletal y reparación celular tras el tratamiento térmico a los dos pHs, mediante la recuperación de los supervivientes en distintas condiciones.
- Validar los resultados obtenidos en dos alimentos, de pH neutro y ácido.

3. METODOLOGÍA

3.1 Microorganismo

En esta investigación se usó el microorganismo *Bacillus subtilis* CECT 4524. Se utilizó una suspensión de esporos disponible en el laboratorio, que había sido obtenida una temperatura de esporulación de 30°C durante 4 días. Los esporos se encontraban diluidos en agua destilada estéril y mantenidos en refrigeración a 4°C.

3.2 Medios de tratamiento y de recuperación.

Como **medio de tratamiento** para los estudios realizados con calor se utilizó tampón citrato-fosfato (McIlvaine) de pH 7,0 y pH 4,0. Ocasionalmente se utilizaron también dos alimentos líquidos estériles como medio de tratamiento: leche entera (Hacendado) y zumo de naranja (Hacendado). Como **medios de recuperación** se utilizó agar nutritivo (AN, Oxoid, Madrid, España) con o sin adición de glutatión (Sigma Aldrich, Milán, Italia), y de NaCl (Panreac S.A., Barcelona, España).

Por último, en algunos casos se utilizó agar mínimo M₉ con glucosa (Panreac S.A., Barcelona, España) para la recuperación celular. Para la preparación de este agar se partió de una preparación de agar purificado al 1,5% (Technical Agar, Oxoid), hervida, esterilizada y atemperada, a la que se añadió una mezcla de sales M₉ (Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl y NH₄Cl), además de MgSO₄·7H₂O, FeSO₄ (10 mg/L), CaCl₂ y glucosa 0,05% (Stanier *et al.*, 1992). Este medio se enriqueció con L-cisteína-HCl (Sigma Aldrich, Milán, Italia) para crear unas condiciones de bajo potencial redox (Suh y Knabel, 2000). Todo ello se esterilizaba previamente por filtración, con filtros de 0,22 µm (VWR International, USA).

Tras su preparación, todos estos medios se esterilizaron durante 20 minutos a 120°C en un autoclave (modelo Darlba K-400, Terrassa, Barcelona) y se almacenaron a temperatura ambiente.

3.3 Determinación de las concentraciones máximas no inhibitorias (CMNI) para glutatión, cisteína y NaCl.

Para la determinación de las CMNI de los diferentes compuestos utilizados en esta investigación se llevó a cabo el siguiente procedimiento. Se añadió al AN o al medio mínimo M₉ una vez esterilizados y atemperados, las concentraciones elegidas

previamente de los diferentes compuestos. El NaCl (0-14%) y el glutatión (0-100 mM) se añadieron al AN (AN-NaCl y AN-Glut, respectivamente), mientras que la cisteína (0-50 mM) se añadió al medio mínimo M₉ (M₉-cys). El rango de concentraciones estudiado se escogió a partir de experimentos previos realizados en el laboratorio (Marcén, 2014).

La suspensión de *B. subtilis* se diluyó en agua destilada estéril hasta la concentración deseada y se sembraron por homogenización en masa placas con los ágaros preparados previamente, inoculando siempre la misma cantidad de microorganismos. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas. Se procedió al recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) por placa y se representaron los logaritmos del recuento de las UFC frente a la concentración. A partir de estos recuentos se determinaron las CMNI para cada compuesto, eligiendo como criterio aquella concentración que permite el crecimiento del 80% de la población. En el caso del medio mínimo M₉ las placas fueron incubadas en anaerobiosis (Marcén, 2014).

3.4 Determinación de la resistencia al calor. Termorresistómetro.

La determinación de la resistencia al calor se llevó a cabo en el termorresistómetro TR-SC (Condón *et al.*, 1993). Para ello, antes y después de cada sesión de trabajo se esterilizaron (20 minutos; 120°C) tanto el equipo como el medio de tratamiento. Una vez el medio (350 ml de McIlvaine) estaba estabilizado a la temperatura de tratamiento, se inyectaron 0,35 ml de la suspensión microbiana en la cámara de tratamiento (400 ml) mediante una jeringuilla esterilizada desechable (Terumo Europe España S.L., Alcalá de Henares, Madrid, España). Durante el tratamiento y a intervalos de tiempo predeterminados se extrajeron muestras de 0,20 ml directamente en placas de Petri estériles, a las que inmediatamente se le añadía el medio de recuperación (AN) estéril, fundido y atemperado (45°C). Finalmente en algunos experimentos, se extrajeron muestras del equipo a eppendorfs a diferentes intervalos de tiempo, los cuales se enfriaron con hielo y se sembraron (0,1 mL) tanto en AN como en medio mínimo M₉, suplementados con diferentes compuestos. Las placas se homogeneizaron y posteriormente se incubaron a 37°C /48 h para su posterior recuento

3.5 Construcción de curvas de supervivencia y modelización matemática.

Las placas provenientes de los distintos tratamientos se incubaron a 37°C en condiciones de aerobiosis excepto las de medio mínimo M₉, que fueron incubadas en anaerobiosis. Tras 48 horas de incubación se procedió a su recuento mediante un contador automático, por análisis de imagen.

La construcción de las curvas de supervivencia se realizó por medio del software GraphPad PRISM 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Se representó el logaritmo del número de microorganismos por placa ($\log N_t$), frente al tiempo de tratamiento en minutos.

Posteriormente se procedió a la modelización de estas curvas para poder llevar a cabo una comparación entre ellas. Para ello se empleó la herramienta de modelo de ajuste GInaFiT (KU Leuven, Leuven, Bélgica) de Microsoft Office Excel 2007. Debido a que las curvas de supervivencia obtenidas en este trabajo presentaban o un perfil recto o un perfil convexo (fase de hombro seguido de una posterior caída exponencial), se empleó el modelo de log. lineal – hombro de Geeraerd *et al.* (2000), que permitía describir ambos tipos de curva. Este modelo describe las curvas de supervivencia a través de dos parámetros: la longitud del hombro (SL), definido como la dosis o tiempo antes de que comience la inactivación exponencial, que en nuestro caso se expresaba en minutos; y la tasa de inactivación (K_{max}), que se define como la pendiente de la parte exponencial de la curva de supervivencia (min^{-1}). La ecuación que define este modelo es la que se presenta a continuación:

$$\log_{10}(N) = \log_{10}(N_0) - K_{max} * t / \ln(10) + \log_{10}(\exp(K_{max} * SL)) / (1 + (\exp(K_{max} * SL) - 1) * \exp(-K_{max} * t)))$$

3.6 Cálculo de los parámetros de resistencia y análisis estadístico.

Los parámetros de resistencia SL y K_{max} fueron proporcionados por el modelo de Geeraerd *et al.* (2000), mencionado en el apartado anterior. Posteriormente se calcularon el valor $2D$ y el valor D_t .

A partir de la K_{max} se determinó el parámetro D_t , o tiempo de reducción decimal correspondiente a la porción recta de la curva de supervivencia, multiplicando por 1/2,303. El valor D_t se define como el tiempo en minutos a la temperatura “t” que es

preciso tratar a la población microbiana para reducir el recuento un ciclo logarítmico. Se consideró conveniente calcular este parámetro ya que es muy frecuentemente utilizado en los estudios de Termobacteriología.

El valor $2D$ se calculó con la siguiente fórmula: $D: Sl + n^o \text{ ciclos} \times (2,303 / K_{max})$. Este valor indica el tiempo de tratamiento que hay que aplicar a una temperatura determinada para conseguir eliminar al 99% de la población, es decir, los dos primeros ciclos logarítmicos. Este parámetro permite evaluar de manera integrada la duración del hombro y la velocidad de inactivación en la parte lineal de la curva.

Posteriormente, se calculó el valor z mediante el modelo secundario de Bigelow (1921) representando el logaritmo del valor D_t frente a la temperatura de tratamiento (gráfica de termodestrucción). Para obtener este valor z se calculó la inversa negativa de la pendiente de la gráfica de termodestrucción, definiendo este valor como el número de grados que hay que variar la temperatura para cambiar la velocidad de inactivación térmica diez veces. También se utilizó una representación análoga para la longitud del hombro en función de la temperatura de tratamiento.

Los datos experimentales se obtuvieron al menos por duplicado. A no ser que se especifique otra opción, los datos incluidos en las gráficas representan la media y la desviación estándar (barras de error). La bondad de los ajustes del modelo de Geeraerd a los datos experimentales se evaluó mediante el uso del coeficiente de determinación (R^2) y el RMSE (raíz cuadrada del error cuadrático medio), proporcionados por la herramienta GinaFit. Cuanto mayor es R^2 y menor es RMSE, mejor describe el modelo los datos experimentales. Las comparaciones estadísticas se llevaron cabo mediante el test t de Student, utilizando el software Graphpad PRISM 5, considerándose diferencias significativas para $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Termorresistencia de *B. subtilis* en tampón de pH 7,0.

En primer lugar se caracterizó la resistencia al calor de los esporos de *B. subtilis* en medio de pH 7,0. Para ello se obtuvieron las gráficas de supervivencia a diferentes temperaturas y se procedió a modelizarlas matemáticamente.

Con el fin de comprobar que la metodología utilizada presentaba una buena repetitividad tras la aplicación del tratamiento, se obtuvieron tres gráficas de supervivencia a 102°C de *B. subtilis* en tampón McIlvaine de pH 7,0 (Figura 4.1A). Como se puede observar, las tres gráficas prácticamente se superponían, de manera que el método utilizado puede considerarse adecuado. Por otro lado, las gráficas mostraron un perfil no lineal.

Con objeto de poder describir adecuadamente el perfil de estas curvas, se utilizó el modelo hombro-log lineal de Geeraerd. Este modelo proporciona dos parámetros de resistencia, la duración del hombro (Sl , min) y la velocidad de inactivación en la porción lineal de la curva (K_{max} , min⁻¹). A partir de este último parámetro, se puede calcular fácilmente el tiempo de reducción decimal D_t (min), mediante una transformación matemática (ver Metodología). La Figura 4.1B muestra el ajuste al modelo de las tres gráficas de supervivencia obtenidas a 102°C, a modo de ejemplo. Se obtuvieron valores R^2 de 0,93-0,99, lo que indicaba que el modelo describía adecuadamente las curvas obtenidas experimentalmente. En esta Figura los puntos son los datos experimentales, y las líneas corresponden al modelo matemático utilizado.

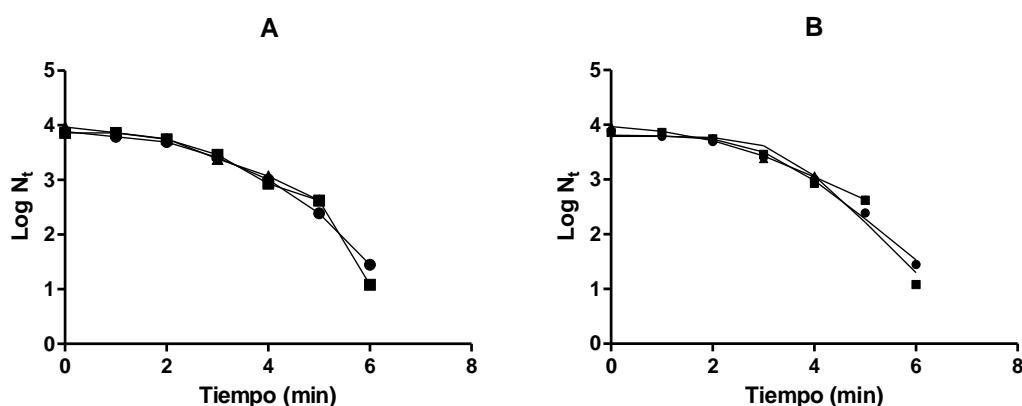


Figura 4.1. Gráfica de supervivencia de *B. subtilis* a 102°C en tampón de pH 7,0 (A). Ajuste del modelo de Geeraerd a los datos experimentales (B).

Tras estudiar la repetitividad de la metodología usada y la adecuación del modelo para obtener los parámetros que permitieran posteriormente comparar los resultados obtenidos, se obtuvieron las curvas de supervivencia a 5 temperaturas de tratamiento a pH 7,0. Los datos se muestran en la Figura 4.2.

Los resultados mostraron un aumento en la inactivación de *B. subtilis* conforme se incrementaba la temperatura de tratamiento. Además, en todos los casos, las gráficas mostraron un perfil no lineal, pudiéndose distinguir un fenómeno de hombro cuya longitud se reducía a medida que aumentaba la temperatura de tratamiento.

La causa de la aparición de los hombros en las gráficas de supervivencia de los esporos bacterianos no se conoce con precisión. Según algunos autores (Palop, 1995), los hombros se deberían a la aparición de dos procesos diferentes durante los primeros instantes del tratamiento térmico, la inactivación térmica y la activación de los esporos latentes. La mayoría de los esporos presentes en una población bacteriana se hallarían en estado latente, de modo que sería necesaria una activación de los mismos previa a la destrucción por el calor (Palop, 1995). La reducción del hombro conforme aumentaba la temperatura de tratamiento podría deberse, por lo tanto, a que a mayor temperatura la activación celular se produciría más rápidamente disminuyendo así el tiempo necesario para el comienzo de la inactivación. Otra razón que podría justificar la presencia de un hombro en las gráficas de supervivencia es la existencia tras el tratamiento de células viables, pero con lesiones subletales. Estas células no comenzarían a inactivarse hasta que el número o la severidad de las lesiones superasen un determinado nivel umbral. Aunque los fenómenos de daño subletal se asocian habitualmente a las células vegetativas, también pueden tener lugar en suspensiones de esporos bacterianos, bien relacionados con alteraciones en las estructuras físicas del esporo o con alteraciones en su sistema de germinación, necesario para el crecimiento posterior (Mackey, 2000).

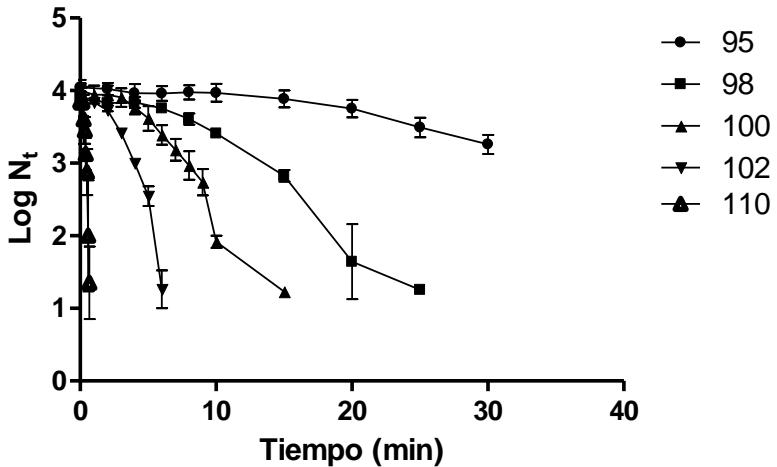


Figura 4.2. Curvas de supervivencia de *B. subtilis* a distintas temperaturas en tampón de pH 7,0.

En todos los casos se procedió a modelizar cada curva individualmente, obteniéndose los parámetros del modelo de Geeraerd, así como los índices de los ajustes del modelo, que se muestran en la Tabla 1.1. Los resultados numéricos mostraron una disminución del fenómeno de hombro (SI) conforme aumentaba la temperatura, al igual que se podía observar en la Figura 4.2. Además, se observó un aumento en la velocidad de inactivación (K_{max}) con el aumento de temperatura. A partir de este parámetro se obtuvo el valor D_t , observándose una disminución conforme aumentaba la temperatura de tratamiento. Esto indicaba que conforme aumentaba la temperatura era necesario menos tiempo de tratamiento para lograr una reducción decimal, como era esperable (Palop et al., 1999). Los valores D_t obtenidos fueron similares a los descritos previamente para otras cepas de *B. subtilis* (Palop, 1995).

La Figura 4.3 muestra la recta de termodestrucción que se obtuvo tras el tratamiento térmico de *B. subtilis* a las distintas temperaturas en tampón McIlvaine de pH 7,0. En esta Figura se representó el logaritmo del valor D_t frente a la temperatura, y a partir de la ecuación de la recta se obtuvo el valor z . El valor z se define como el número de grados centígrados que hay que incrementar la temperatura para reducir un ciclo logarítmico el valor D_t . Los puntos intermedios entre las temperaturas de 102°C y 110°C no aparecen en la Tabla 4.1 al no realizarse réplicas para esas temperaturas, ya que se llevaron a cabo como comprobación adicional de la linealidad de la gráfica. El valor z obtenido en estas condiciones experimentales fue de 7,3°C.

Tabla 4.1 Termorresistencia de *B. subtilis* a pH 7,0: parámetros del ajuste del modelo de Geeraerd a los datos experimentales

T ^a	Sl	K _{max}	D _t	2D	R ²	RMSE
95	21,2	0,171	13,5	48,0	0,986	0,029
	20,5	0,178	12,9	46,3	0,965	0,052
	19,4	0,146	15,7	50,8	0,955	0,055
98	8,71	0,331	6,97	22,6	0,992	0,053
	7,43	0,387	5,95	19,3	0,965	0,201
	9,90	0,555	4,15	18,2	0,976	0,140
100	5,12	0,841	2,74	10,6	0,956	0,192
	4,30	0,657	3,50	11,3	0,980	0,091
	4,87	0,823	2,79	10,5	0,954	0,143
102	2,99	1,74	1,32	5,64	0,988	0,096
	3,33	2,15	1,07	5,48	0,934	0,257
	2,09	1,04	2,21	6,50	0,995	0,037
110	0,367	15,8	0,146	0,660	0,927	0,212
	0,332	17,5	0,132	0,595	0,976	0,114
	0,381	21,5	0,107	0,596	0,943	0,240

Sl: duración del hombro (shoulder length), min.

K_{max}: constante de inactivación, min⁻¹

D_t: tiempo de reducción decimal, min.

2D: tiempo para inactivar los dos primeros ciclos logarítmicos, min.

R²: coeficiente de determinación.

RMSE: error cuadrático medio.

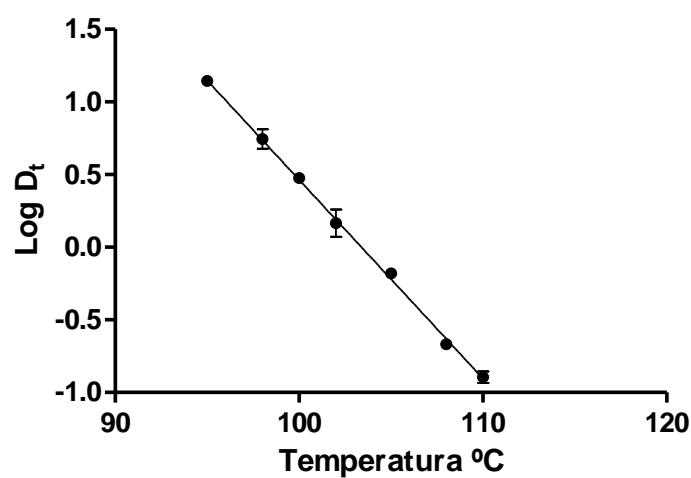


Figura 4.3. Gráfica de termodestrucción (Log D_t / T^a) obtenida en tampón de pH 7,0.

4.2 Termorresistencia de *B. subtilis* en tampón de pH 4,0.

Una vez caracterizada la resistencia al calor de los esporos de *B. subtilis* en medio de pH 7,0, se estudió su resistencia a pH 4,0.

La Figura 4.4 muestra dos gráficas de supervivencia a 100°C de *B. subtilis*, en tampón McIlvaine de pH 7,0 y pH 4,0. Como se puede observar en la Figura, para la misma temperatura de tratamiento, se obtuvo una menor termorresistencia al reducir el pH del medio.

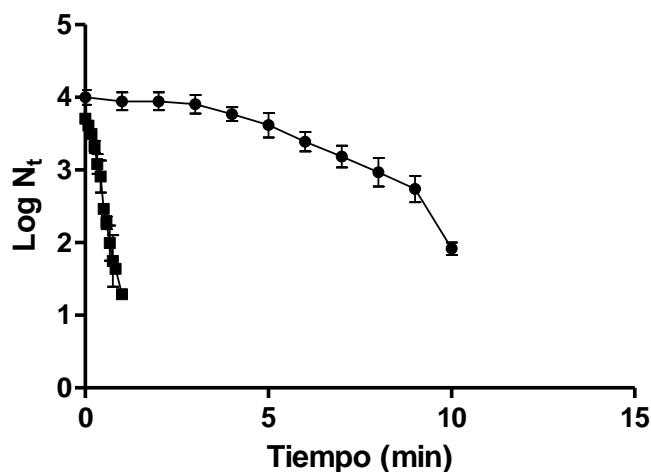


Figura 4.4. Comparación entre curvas de supervivencia de *B. subtilis* a 100°C en tampón de pH 7,0 (●) y pH 4,0 (■).

Al igual que en el caso del tratamiento a pH 7,0, se obtuvieron las gráficas de supervivencia a diferentes temperaturas a pH 4,0 (Figura 4.5). Los resultados de esta Figura muestran que, al igual que ocurría a pH 7,0, conforme se aumentó la temperatura de tratamiento, se incrementó la velocidad de inactivación.

La Tabla 4.2 muestra los parámetros del ajuste del modelo de Geeraerd a los datos experimentales obtenidos tras el tratamiento a estas 4 temperaturas. Si se comparan con los datos obtenidos a pH 7,0 (Tabla 4.1 y Figura 4.2), se puede observar que al disminuir el pH se produjeron cambios en la cinética de inactivación, de manera que se redujo la duración del hombro. Además, al disminuir el pH se aumentaron los valores de Kmax, es decir, se obtenía una gráfica de supervivencia con una mayor pendiente. En resumen, se obtenía una mayor letalidad a igual temperatura, hecho que se observa fácilmente al comparar los valores 2D obtenidos. El parámetro

2D representa el tiempo necesario para reducir los dos primeros ciclos logarítmicos de la población, incluyendo de manera conjunta la duración del hombro y la velocidad de inactivación en la porción lineal. Por ejemplo, a 95°C, para inactivar dos ciclos logarítmicos se necesitó un tiempo de tratamiento 20 veces menor a pH 4,0 que a pH 7,0, por lo que supone una ventaja acidificar el medio, evitando así tratamientos tan intensos. Por otro lado, a temperaturas de 102°C se obtuvo una diferencia en el parámetro 2D de 12 veces. Por lo tanto, el efecto del pH era más notable a temperaturas bajas de tratamiento. De acuerdo con Palop et al. (1999), al disminuir el pH se disminuye la termodependencia de la inactivación, hecho que se comprobó al obtener el valor z . La Figura 4.6 muestra la gráfica de termodestrucción que se obtuvo tras los tratamientos a pH 4,0. A partir de ella se calculó el valor z , que fue de 9,6°C.

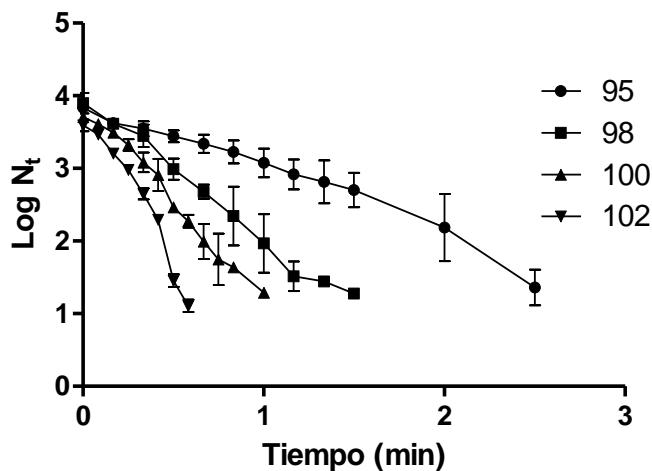


Figura 4.5. Curvas de supervivencia de *B. subtilis* a distintas temperaturas en tampón de pH 4,0.

Una vez estudiada la termorresistencia de *B. subtilis* en ambos medios de tratamiento, se pasó a comparar el valor z obtenido.

La Figura 4.7A muestra la gráfica de termodestrucción ($\log D_t / T^a$) para *B. subtilis* tratado en ambos pHs. Como se puede observar, de acuerdo con Sala et al. (1995), la inactivación a pH 4,0 fue siempre más rápida que a pH 7,0, dentro del rango de temperatura estudiado. No obstante, la termodependencia (valor z) era diferente, de manera que ambas gráficas tendían a aproximarse a temperaturas elevadas de tratamiento.

Tabla 4.2. Termorresistencia de *B. subtilis* a pH 4,0: parámetros del ajuste del modelo de Geeraerd a los datos experimentales.

T ^a	Sl	K _{max}	D _t	2D	R ²	RMSE
95	0,309	2,62	0,880	2,07	0,989	0,080
	0,752	2,42	0,952	2,66	0,971	0,129
	0,492	2,57	0,895	2,28	0,980	0,125
98	0,104	6,28	0,367	0,837	0,975	0,167
	0,183	4,75	0,485	1,15	0,975	0,133
	0,132	4,44	0,519	1,17	0,981	0,126
100	0,199	9,29	0,248	0,695	0,979	0,115
	0,174	7,28	0,316	0,806	0,975	0,134
	0,059	6,20	0,371	0,802	0,989	0,085
102	0,224	14,9	0,155	0,534	0,982	0,117
	0,212	15,3	0,151	0,513	0,982	0,126
	0,136	12,7	0,181	0,499	0,977	0,142

Sl: duración del hombro (shoulder lenght), min.

K_{max}: constante de inactivación, min⁻¹

D_t: tiempo de reducción decimal, min.

2D: tiempo para inactivar los dos primeros ciclos logarítmicos, min.

R²: coeficiente de determinación.

RMSE: error cuadrático medio.

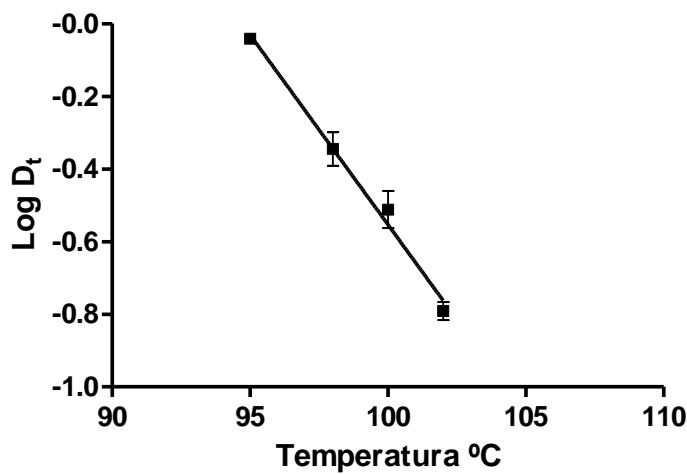


Figura 4.6. Gráfica de termodestrucción (Log D_t / T^a) en tampón de pH 4,0.

La Figura 4.7B muestra la gráfica de $\log Sl / T^a$ para la obtención del valor z a partir de la longitud de hombro (Sl). Esta Figura mostró que la longitud del hombro a pH 4,0 era siempre menor que a pH 7,0. Además, a diferencia de la línea correspondiente a pH 7,0, que muestra una tendencia lineal descendente a medida que aumenta la temperatura de tratamiento, en medio de tratamiento de pH 4,0 la longitud del hombro fue siempre pequeña, al azar y no siguió una tendencia clara con la T^a . A efectos prácticos se puede considerar que el fenómeno de hombro era inexistente.

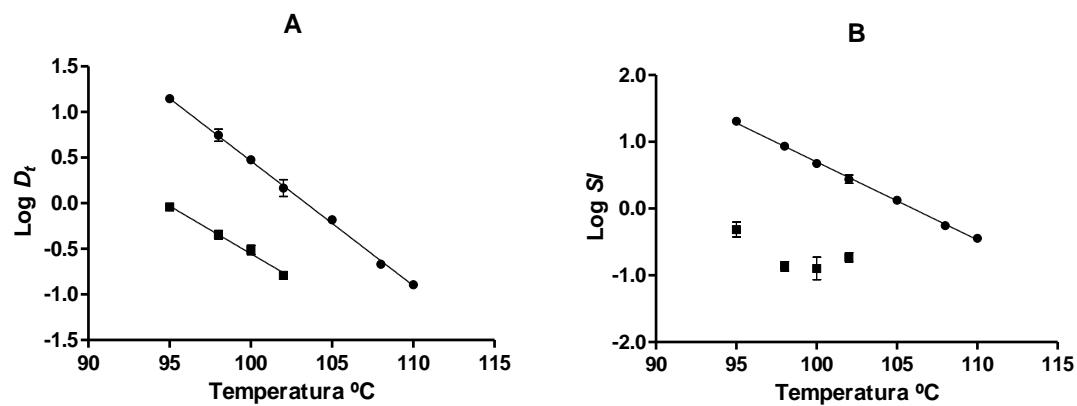


Figura 4.7. $\log D_t$ a distintas temperaturas tratamiento obtenido en tampón de pH 7, 0 (●) y pH 4,0 (■) (7A). $\log Sl$ a distintas temperaturas de tratamiento obtenido en tampón de pH 7,0 y pH 4,0 (7B).

A modo de resumen y para poder comparar las dos condiciones la Tabla 4.3 muestra los valores z obtenidos a partir de las gráficas de termodestrucción, realizadas a partir de los valores $\log D_t$ y $\log Sl$ en medio de pH 7,0 y pH 4,0.

Tabla 4.3. Valores z obtenidos a partir de las gráficas de termodestrucción de *B. subtilis* a pH 7,0 y pH 4,0.

	Z	R^2	Z_{Sl}	R^2
pH 7,0	7,3	0,99	8,6	0,99
pH 4,0	9,6	0,96	-	-

4.3 Daño celular.

4.3.1 Determinación de las condiciones de recuperación.

La ausencia de un fenómeno de hombro relevante en las gráficas de supervivencia obtenidas a pH 4,0 podría estar indicando que, bajo estas condiciones experimentales, no se producían fenómenos de daño subletal y reparación. Con objeto de obtener conocimiento acerca de este aspecto, se pasó a determinar el daño celular producido en *B. subtilis* tras el tratamiento térmico en tampón McIlvaine de pH 7,0 y pH 4,0 y su recuperación en distintos medios. Se escogieron medios de recuperación que, por analogía con células vegetativas, o impiden la reparación de las células dañadas subletalmente (medios selectivos) o por el contrario, la mejoran (Mackey, 2000; Marcén, 2014; Marcén et al, 2017). La comparación entre el número de supervivientes observado en unas condiciones desfavorables y unas favorables, permite detectar la presencia de células dañadas.

Como medio selectivo se utilizó agar nutritivo con NaCl (AN-NaCl), ya que el NaCl inhibe el crecimiento de células con la membrana citoplasmática dañada. Como medios capaces de mejorar la reparación celular se escogieron agar nutritivo con glutatión (AN-glut) y medio mínimo M9 sales-glucosa suplementado con cisteína (M₉-cys). Estos dos medios contienen componentes antioxidantes y/o bajo potencial redox, condiciones que mejoran la recuperación celular. En el caso del medio M₉-cys se utilizó además atmósfera de anaerobiosis (Marcén et al, 2017).

Para ello, en primer lugar se determinaron las concentraciones de cada compuesto a utilizar, siempre por debajo de la CMNI (Concentración Máxima No Inhibitoria) para cada compuesto, definida como aquella concentración que no inhibía más del 20% del recuento de los esporos nativos (ver Metodología).

La Figura 4.8A muestra los recuentos obtenidos en esporos nativos, es decir, sin recibir tratamiento térmico, en AN con distintas concentraciones de NaCl. La Figura 4.8B muestra los recuentos obtenidos en AN con distintas concentraciones de glutatión y por último la Figura 4.8C muestra los recuentos obtenidos en medio mínimo M₉ suplementado con distintas concentraciones de cisteína.

En las Figuras todos los puntos mostraron recuentos fiables en placa hasta el punto marcado con una flecha, a partir de ese punto no se obtuvieron recuentos en

placa. Como se puede observar en las Figuras, todos los compuestos ejercían una acción inhibitoria sobre *B. subtilis* a partir de una concentración umbral.

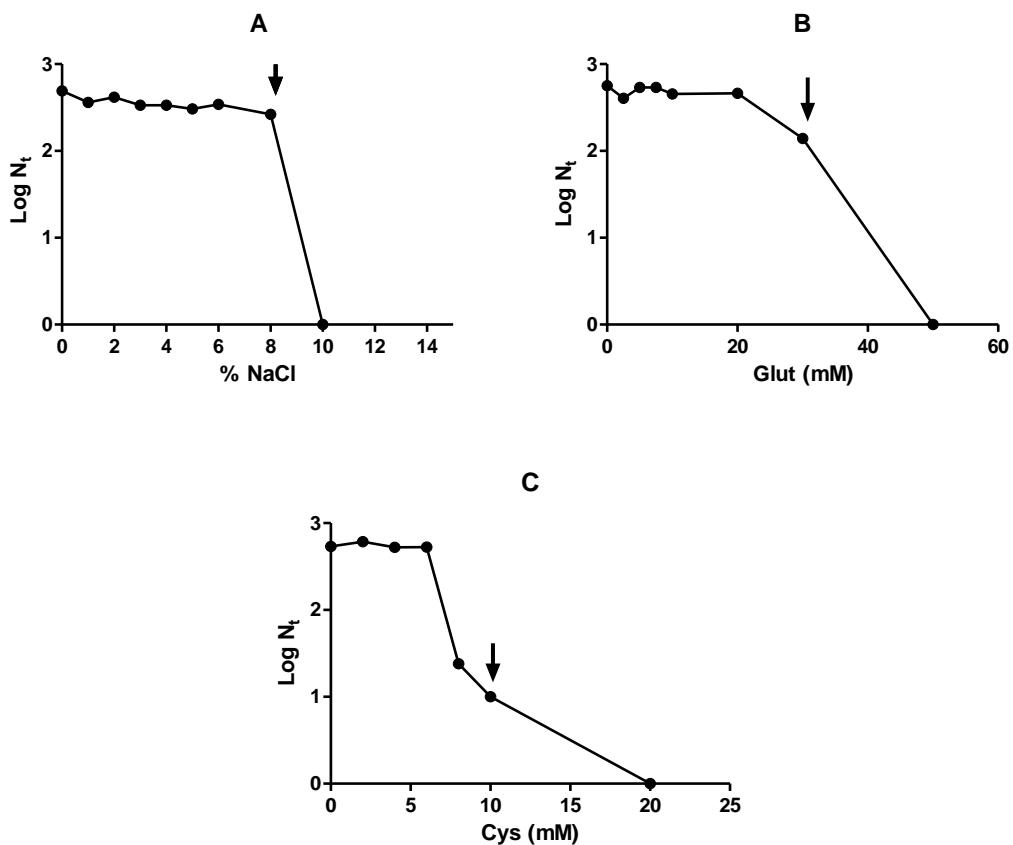


Figura 4.8. Determinación de las concentraciones máximas no inhibitorias para NaCl (A), glutatión (B) y cisteína (C) para *B. subtilis*.

A partir de estas gráficas se eligieron las condiciones adecuadas para experimentos posteriores. En la Tabla 4.4 se muestran las concentraciones elegidas para cada compuesto.

Tabla 4.4. Concentraciones elegidas para posteriores experimentos.

Compuesto	Concentración elegida
NaCl	5%
Glutatión	7,5 mM
Cisteína	3 mM

4.3.2 Reparación celular de esporos tras el tratamiento térmico en medios de pH 7,0 y pH 4,0.

Una vez elegidas las condiciones de recuperación celular, se pasó a determinar la presencia de fenómenos de daño subletal y reparación celular de los esporos tras el tratamiento térmico. Los esporos se trajeron a distinta temperatura según el pH del medio de calentamiento: 102°C a pH 7,0 y a 95°C a pH 4,0. Así, se pretendía obtener una velocidad de inactivación similar y poder comparar mejor los resultados obtenidos.

La Figura 4.9A muestra las curvas de supervivencia de los esporos de *B. subtilis* en los distintos medios de recuperación tras el tratamiento térmico a 102°C en tampón McIlvaine de pH 7,0, mientras que la Figura 4.9B muestra las curvas obtenidas tras el tratamiento térmico a 95°C en tampón McIlvaine de pH 4,0.

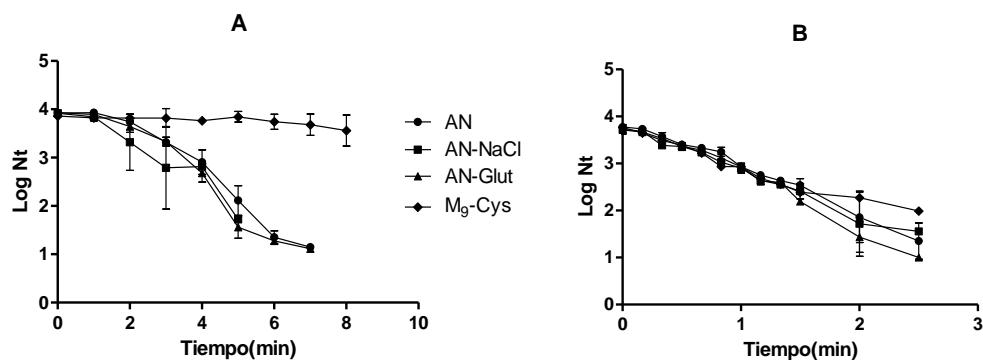


Figura 4.9. Recuperación celular en distintos medios de esporos tratados térmicamente a 102°C en medio de pH 7,0 (A) y a 95°C en medio de pH 4,0 (B)

Las gráficas mostraron diferencias en la recuperación celular dependiendo del pH del medio de calentamiento. En la Figura 4.9A se puede observar que, para las células tratadas en medio neutro, el medio mínimo M₉ con cisteína creó unas condiciones de recuperación más favorables. Sin embargo, en el resto de condiciones estudiadas no se observaron apenas diferencias. Ni la presencia de NaCl parecía inhibir el crecimiento y/o germinación de los esporos tratados, ni la presencia de glutatión mejoraba la supervivencia celular. El efecto protector de medio M₉-cys en anaerobiosis podría ser debido a su bajo potencial redox. También podría ser debido a la ausencia de especies reactivas del oxígeno, que se forman habitualmente en los medios de cultivo complejos como consecuencia del autoclavado y la exposición a la luz (Mackey and

Seymour, 1987; Mackey, 2000). Estos componentes podrían resultar tóxicos para los esporos dañados por el calor.

En el caso de la recuperación tras el tratamiento a pH 4,0 (Figura 4.9B) no se observaron diferencias entre las cuatro condiciones estudiadas.

A modo de comparación, la Figura 4.10 muestra los ciclos logarítmicos de inactivación en cada uno de los diferentes medios de recuperación para un tiempo fijo de exposición al tratamiento térmico. El tiempo de exposición elegido fue aquel en el que se habían alcanzado dos ciclos de inactivación cuando se recuperaba en agar nutritivo, por ello, fue diferente en cada uno de los pHs de los medios de tratamiento. En el caso del tratamiento a pH 7,0, el tiempo elegido fue de 5 minutos (Figura 4.10A) y en el caso del tratamiento a pH 4,0 se eligió un tiempo de 2 minutos (Figura 4.10B).

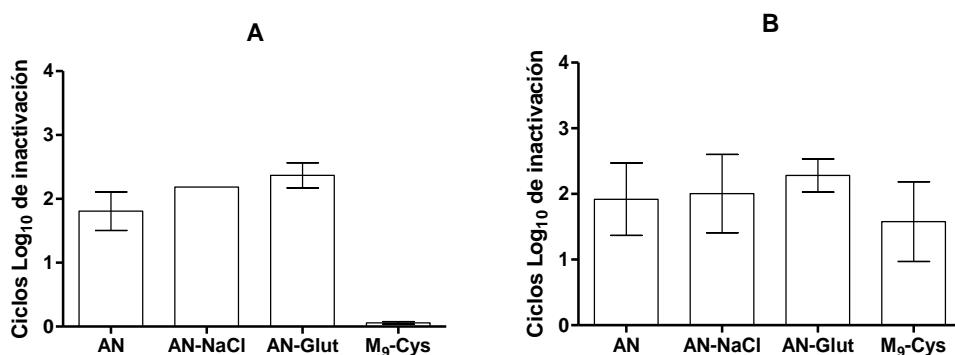


Figura 4.10. Ciclos de inactivación de *B. subtilis* tras un tiempo fijo de exposición (5 min) a 102°C en medio de tratamiento de pH 7,0 (A) y tras un tiempo fijo de exposición (2 min) a 95°C en medio de tratamiento de pH 4,0 (B).

Tal y como se había dicho anteriormente, sólo se observaron diferencias en la recuperación cuando los esporos fueron tratados a pH 7,0, ya que se obtuvo un mayor recuento celular cuando se recuperó en medio mínimo M₉ suplementado con cisteína ($p<0,05$). Sin embargo en el resto de las condiciones estudiadas, tanto al tratar a pH 7,0 como al tratar a pH 4,0, no se observaron diferencias ($p>0,05$).

Estos resultados parecen indicar que es posible una mayor recuperación de los esporos tras el tratamiento cuando se utilizan unas condiciones más adecuadas, como es el caso del medio mínimo M₉-cys en anaerobiosis. De hecho, en la Figura 4.9 se observa cómo apenas se conseguía inactivación celular tras 8 minutos de exposición a

102°C en medio neutro, cuando las células se recuperaron en M₉-cys. No obstante, cuando las células son tratadas a pH ácido los daños producidos intracelularmente parecen ser más intensos que a pH neutro, por lo que las células no se pueden recuperar aún en condiciones respetuosas. Este comportamiento también podría deberse a que las moléculas y enzimas implicadas en los mecanismos de reparación del daño subletal en los esporos resultaran más severamente afectadas tras el calentamiento a pH 4,0, en comparación a pH 7,0, resultando ineficientes durante el periodo de recuperación, germinación y crecimiento tras el tratamiento.

En la práctica es muy importante utilizar condiciones de recuperación adecuadas, ya que si no, se puede estar subestimando el número de células que realmente sobreviven al tratamiento. De acuerdo a nuestros resultados, la presencia de esporos dañados subletalmente, capaces de repararse y crecer, depende de las condiciones en las que se aplicó el tratamiento térmico, en este caso, del pH.

4.3.3 Reparación celular de esporos tras el tratamiento térmico en alimentos.

Una vez determinada la presencia de fenómenos de daño subletal y reparación celular de los esporos tras el tratamiento térmico en los tampones de distinto pHs se pasó a determinar la presencia de fenómenos de daño subletal y reparación celular de los esporos tras el tratamiento térmico en dos alimentos de pH similar a los utilizados previamente, leche entera (pH 6,8) y zumo de naranja (3,6). Se escogieron dos condiciones de recuperación, AN y M₉-Cys en anaerobiosis.

Los esporos se trataron a distinta temperatura según el pH del medio de calentamiento: 102°C en leche, y 95°C en zumo de naranja. Así, se pretendía poder comparar con los datos obtenidos en los tampones de pH 7,0 y pH 4,0.

La Figura 4.11A muestra las curvas de supervivencia de los esporos de *B. subtilis* en los dos medios de recuperación tras el tratamiento térmico a 102°C en leche entera, y en tampón de pH 7,0 mientras que la Figura 4.11B muestra esas mismas curvas obtenidas a 95°C en zumo de naranja y en tampón de pH 4,0. Las curvas obtenidas en tampones son las mismas que se muestran en la Figura 4.9, y se han incluido aquí a efectos comparativos. Como se puede observar en la Figura, *B. subtilis* resultaba inactivado en los alimentos dentro del rango de tiempo y temperatura próximo al tampón de pH similar.

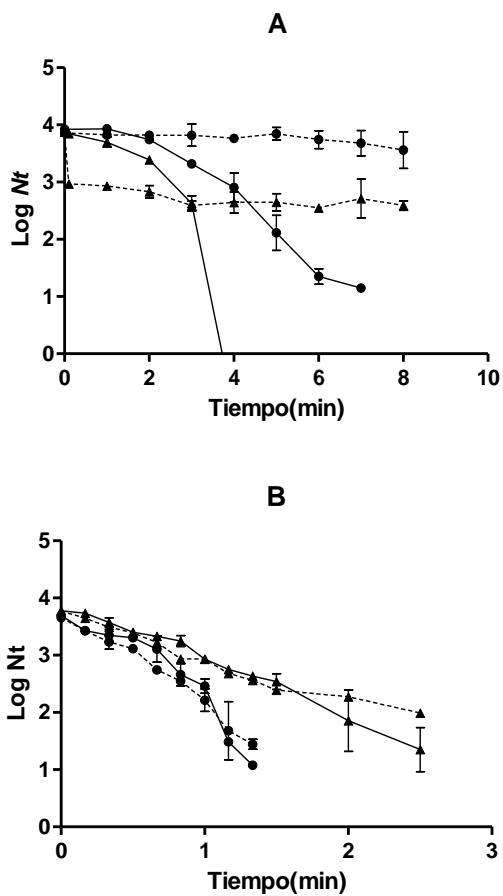


Figura 4.11. Supervivencia al calor de *B. subtilis* en alimentos y en tampones de pH similar. 11A: gráficas obtenidas en leche entera (●) y en tampón de pH 7,0 (▲); 11B: gráficas obtenidas en zumo de naranja (●) y en tampón de pH 4,0 (▲). Los esporos se recuperaron en AN (línea continua) o en M₉-cys (línea discontinua).

En la Figura 4.11A se puede observar, en primer lugar, que los esporos fueron ligeramente más termosensibles cuando se trataban en leche, en comparación al tampón de pH neutro. Ello podría ser quizás debido a la diferencia en el pH, de 0,2 unidades, o a la presencia en la leche de algún componente inhibidor o capaz de modificar algún otro parámetro físicoquímico, como por ejemplo, el potencial redox. En cualquier caso, en ambos medios de tratamiento, el medio mínimo M₉ con cisteína creó unas condiciones de recuperación más favorables. Sin embargo, cuando las células se trataban en leche, se observaba un descenso instantáneo de 1 ciclo log, aproximadamente, del número de esporos viables. La población superviviente a este descenso inicial prácticamente se mantuvo sin pérdida de viabilidad durante los 8 minutos de calentamiento, al igual que ocurría cuando se trataban en tampón.

En el caso del tratamiento en el zumo de naranja (Figura 4.11B) no se observaron diferencias entre ambos medios de recuperación, al igual que ocurría en la recuperación tras el tratamiento en tampón de pH 4,0. Sin embargo se observaron diferencias entre tratar los esporos en medio tamponado o en zumo de naranja, ya que en este último medio, la termorresistencia observada fue ligeramente menor. Al igual que ocurría en el caso de la leche, esta diferencia puede atribuirse al ligeramente distinto pH, 0,4 unidades de diferencia, o a la presencia de componentes en el zumo que pudiesen modificar otras características físico químicas, o que pudiesen ejercer algún efecto antimicrobiano, como por ejemplo, los ácidos orgánicos.

En resumen, estos resultados muestran que la inactivación térmica de los esporos de *B. subtilis* en alimentos estuvo en gran medida determinada por el pH, aunque en los dos alimentos se observó una ligera mayor sensibilidad que en los tampones. Ello podría ser debido a pequeñas diferencias en el pH o a otros factores, como la presencia de sustancias con poder antimicrobiano. Además, se confirma que el pH del medio de tratamiento, en este caso, del alimento, determina que se produzcan o no diferencias importantes en el número de esporos supervivientes al tratamiento dependiendo de las condiciones de recuperación.

5. CONCLUSIONES

- 1^a. La cinética de inactivación frente al calor de los esporos de *B. subtilis* depende del pH del medio de calentamiento: al tratar en pH ácido se observan gráficas de supervivencia rectas, mientras que a pH neutro se observan gráficas con un fenómeno de hombro prolongado. El modelo hombro-log linear de Geeraerd permite describir con precisión todas las gráficas.
- 2^a. La acidificación del pH del medio de tratamiento sensibiliza notablemente a *B. subtilis* frente al calor, dando lugar a curvas de supervivencia con una mayor pendiente y sin hombro. La diferencia en termorresistencia se reduce a medida que se aumenta la temperatura de tratamiento, dentro del rango de temperaturas estudiado, ya que el valor *z* es mayor a pH ácido que a pH neutro.
- 3^a. Los esporos de *B. subtilis* tratados por calor a pH neutro presentan daños subletales reparables, de manera que un medio mínimo en anaerobiosis permite la recuperación de un mayor número de supervivientes, en comparación a un medio complejo. Sin embargo, si el medio de calentamiento es ácido, no existen diferencias en la recuperación celular.
- 4^a. La termorresistencia, la cinética de inactivación y la recuperación celular observada al tratar *B. subtilis* en leche entera y en zumo de naranja es, en general, similar a la obtenida en tampones de pH próximo.

CONCLUSIONS

1st. Kinetics of heat inactivation of *B. subtilis* spores depend on the pH of the heating medium: when they are treated in acidic pH, straight survival graphs are observed, while at neutral pH the graphs show a prolonged shoulder phenomenon. The Geeraerd linear shoulder-log model allows an accurate description of all the graphs.

2nd. Acidification of the treatment menstruum significantly sensitizes *B. subtilis* to heat, leading to survival curves with a greater slope and without shoulder. The difference in thermal resistance is reduced as the treatment temperature is increased, within the range temperatures studied, since z value is higher at acid pH than at neutral pH.

3th. *B. subtilis* spores treated by heat at neutral pH present sublethal repairable damages, in the way that a minimal menstruum in anaerobiosis allows the recovery of a greater number of survivors, compared to a complex menstruum. However, if the heating menstruum is acidic, there are no differences in the cellular recovery.

4th. The heat resistance, kinetics of inactivation and the cellular recovery observed when *B. subtilis* are treated in milk and orange juice is, in general, similar to that obtained in buffers with close pH.

6. APORTACIONES EN MATERIA DE APRENDIZAJE

A pesar de los nervios y los quebraderos de cabeza que el Trabajo de Fin de Grado me ha supuesto en la etapa final del Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos, este trabajo, es una asignatura totalmente diferente al resto, que permite el desarrollo de un trabajo científico de manera más autónoma, aprendiendo aspectos nuevos y aplicando los conocimientos adquiridos a lo largo de la carrera.

En primer lugar, el desarrollo de este trabajo me ha permitido mejorar la planificación y organización, puesto que se aprende a gestionar mejor el tiempo, llevando al día el estudio del resto de asignaturas y compaginándolos con las horas de realización del trabajo. Además, he aprendido a desarrollar un trabajo de laboratorio con la metodología científica, así como a realizar la búsqueda de información precisa de artículos científicos y a redactar un informe.

Así pues, durante este tiempo he aprendido y conocido más específicamente los aspectos relacionados con los esporos bacterianos. También, a analizar y representar gráficamente los resultados obtenidos en cada experimento así como saber interpretarlos y sacar las diferentes conclusiones.

Me ha permitido conocer la importancia de aspectos en los que a lo largo del Grado simplemente estudiás para aprobar una asignatura, como son los parámetros de termorresistencia integrando la asignatura de Tecnología Alimentaria.

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me han ayudado en la realización del presente trabajo. En particular, a mis directoras Pilar Mañas y María Marcen por haberme dado esta oportunidad de trabajar junto a ellas y, sobre todo, por su dedicación y consejo en todo momento, todo esto sin ellas no habría sido posible.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Casp, A., y Abril, J,** 2003. Procesos de conservación de alimentos. Segunda edición. Mundi-Prensa. Madrid
- Cebrián, G.,** 2009. Mecanismos de Inactivación y Resistencia de *Staphylococcus aureus* a Diferentes Procesos de Conservación de los Alimentos. Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza.
- Condón, S., Arrizubieta, M.J., y Sala, F.J.,** 1993. Microbial heat resistance determinations by the multipoint system with the thermoresistometer TR-SC Improvement of this methodology. *Journal of Microbiological Methods* 18(4): 357-366.
- Geeraerd, A.H., Herremans, C.H., and Van Impe, J.F., 2000.** Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology* 59(3): 185-209.
- Huesca-Espitia, L. C., Sánchez-Salas, J. L., and Bandala, E. R.,** 2014. Métodos para la inactivación de esporas en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8(1), 48-67.
- Mackey, B. M., y Seymour, D. A.,** 1987. The effect of catalase on recovery of heat-injured DNA-repair mutants of *Escherichia coli*. *Microbiology*, 133(6), 1601-1610.
- Mackey, B.M.,** 2000. Injured bacteria. En *The microbiological Safety and Quality of Foods*. Vol I. (Lund, B.M.; Baird-Parker, T.C. and Gould, G.W. eds.) pp. 315-341. Gaithersburg: Aspen Publisher, Inc.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., y Parker, J.,** 2003. Brock, Biología de los microorganismos. 10 Edición. Southern Illinois University Carbondate.
- Marcén M.,** 2014. Estudio del estrés oxidativo en bacterias. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Zaragoza.
- Marcén, M., Ruiz, V., Serrano, M. J., Condón, S., y Mañas, P.,** 2017. Oxidative stress in *E. coli* cells upon exposure to heat treatments. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 198-205.
- Palop A.,** 1995. Estudio de la influencia de diversos factores ambientales sobre la termorresistencia de *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* y *B. coagulans*. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.

- Palop, A., Raso, J., Pagán, R., Condón, S., y Sala, F. J.**, 1999. Influence of pH on heat resistance of spores of *Bacillus coagulans* in buffer and homogenized foods. *International Journal of Food Microbiology*, 46(3), 243-249.
- Setlow, P.**, 1998. Small acid-soluble, spore proteins of *Bacillus* species: structure, synthesis, genetics, function and degradation. *Annual Review of Microbiology*, 42, 319–338.
- Setlow, P.**, 2000. Resistance of bacterial spores. En Ed. Storz, G. and Hengge Aronis, R., Bacterial Stress Responses (pags. 217 – 230). *American Society for Microbiology*. Washington, DC.
- Setlow, P.**, 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), 514-525.
- Setlow, P.**, 2008. Dormant spores receive an unexpected wake-up call. *Cell*, 135(3), 410-412.
- Stanier, R.Y., Ingraham, J.L., Wheelis, M.L., y Painter, P.R.**, 1992. Microbiología 2nd ed., Ed. Reverté S.A., Barcelona
- Stumbo, C. R.**, 1965. Thermobacteriology in Food Processing. Academic Press: Londres.
- Suh and Knabel**, 2000. Comparison of different reducing agents for enhanced detection of heat-injured *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 63(8), 1058-1063.