



Facultad de Veterinaria  
**Universidad Zaragoza**



# Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

---

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
1.1. Estructura del espora bacteriano .....	3
1.2. Esporulación .....	5
1.3. Germinación .....	6
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	11
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	12
3.1. Esporulación en medio líquido y recuperación en medio sólido .....	12
3.2. Germinación con aminoácidos .....	12
3.3. Elaboración de curvas de crecimiento.....	13
3.4. Germinación y dipicolinato cálcico.....	13
3.5. Germinación inducida por altas presiones.....	14
3.6. Germinación inducida con HCl y NaOH .....	14
3.7. Tratamientos térmicos.....	14
3.8. Cálculo de los parámetros de resistencia y análisis estadístico de los datos.....	15
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	16
4.1. Selección de la especie objeto de estudio.....	16
4.2. Caracterización de <i>B. weihenstephanensis</i> .....	20
4.2.1. Crecimiento y esporulación .....	20
4.2.2. Ritmo de germinación de <i>B. weihenstephanensis</i> .....	22
4.2.2.1. Germinación con AGFK .....	22
4.2.2.2. Germinación y dipicolinato cálcico.....	23
4.2.2.3. Germinación inducida por altas presiones.....	25
4.2.2.4. Germinación inducida con HCl y NaOH.....	27
4.3. Termorresistencia de <i>B. weihenstephanensis</i> .....	30
4.3.1. Termorresistencia de los esporos de <i>B. weihenstephanensis</i> .....	31
4.3.2. Termorresistencia de las células vegetativas de <i>B. weihenstephanensis</i> .....	32
4.3.3. Exploración de la termorresistencia en fases intermedias de germinación .....	33
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	36
<b>6. CONCLUSIONS</b> .....	37
<b>7. VALORACIÓN PERSONAL</b> .....	38
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	39

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo ha sido caracterizar la germinación de los esporos bacterianos y evaluar la pérdida de resistencia.

La caracterización de la germinación de tres especies microbianas nos permitió seleccionar la especie más adecuada para la consecución de nuestro objetivo (*B. weihenstephanensis*) y obtener así una suspensión con un porcentaje de esporos latentes superior al 90%.

La velocidad de germinación se estudió en presencia de distintos germinantes nutritivos como caldo nutritivo, L-alanina 50 mM, inosina 5 mM, una combinación de L-alanina 50 mM e inosina 5 mM, así como una mezcla de asparagina, glucosa, fructosa y cloruro potásico (AGFK), obteniéndose la mayor velocidad de germinación en presencia de caldo nutritivo (más del 90% de la población en menos de una hora).

Se estudió el efecto de la adición de DPA exógeno en la germinación y se demostró que esta especie no respondía a este estimulante lo que achacamos a que los esporos contenían una cantidad elevada de este compuesto (0,85 pg/esporo) en su protoplasto. La suspensión de los esporos en soluciones 1N de HCl y NaOH inducía su entrada en fase I de germinación, pero reducía el número de esporos capaces de alcanzar la fase de desarrollo. El trabajo demuestra que este fenómeno se debía a la lixiviación del DPA intraprotoplasmático.

Se caracterizó también la germinación física inducida por altas presiones hidrostáticas. Nuestros datos indican que esta tecnología induce la germinación de los esporos en una primera fase y su posterior inactivación. El trabajo incluye también un estudio de la resistencia al calor de esta especie en distintas fases de su ciclo biológico.

## ABSTRACT

The aim of this work has been to characterize the germination of bacterial spores and to evaluate the loss of resistance.

The characterization of the germination of three microbial species allowed us to select the most suitable species for the achievement of our purpose (*B. weihenstephanensis*) and thus obtain a suspension with a percentage of latent spores higher than 90%.

The germination speed was studied in the presence of different nutritive germinants such as nutritive broth, L-alanine 50 mM, inosine 5 mM, a combination of L-alanine 50 mM and inosine 5 mM, as well as a mixture of asparagine, glucose, fructose and potassium chloride (AGFK), obtaining the highest germination speed in the presence of nutritive broth (more than 90% of the population in less than one hour).

The effect of the addition of exogenous DPA on germination was studied and it was demonstrated that this strain did not respond to this stimulant, which we attribute to the fact that the spores contained a high amount of this compound (0,85 pg/spore) in their protoplast. The suspension of the spores in 1N HCl and NaOH solutions induced their entry into stage I of germination, but reduced the number of spores capable of reaching the development phase. The work shows that this phenomenon was due to intraprotoplasmic DPA leaching.

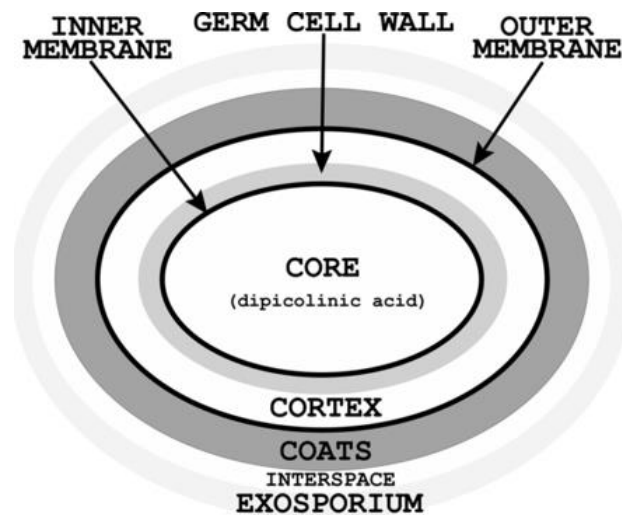
Physical germination induced by high hydrostatic pressures was also characterized. Our data indicate that this technology induces the germination of spores in a first phase and their subsequent inactivation. The work also includes a study of the heat resistance of this species in different phases of its biological cycle.

## 1. INTRODUCCIÓN

Con objeto de suministrar alimentos de calidad y garantizar al mismo tiempo su estabilidad y calidad es necesario controlar la flora microbiana de especies patógenas y alterantes. Según Kohler et al. (2017) el mayor reto al que se enfrenta la industria alimentaria es identificar estrategias adecuadas de descontaminación que aseguren la eliminación de esporos bacterianos afectando mínimamente al sabor y la calidad de los productos.

### 1.1. Estructura del espora bacteriano

Los esporos presentan una serie de envolturas que no se encuentran en las células vegetativas de las que proceden. Desde el exterior al interior del espora se distinguen las siguientes estructuras: el exosporio, la cubierta (“coat”), la membrana externa, el córtex, la pared celular y la membrana interna, que envuelve al protoplasto (Figura 1).



**Figura 1.** Estructura del espora bacteriano. La figura se ha obtenido de Setlow (2014a).

El exosporio es la capa más externa del espora y no está presente en todas especies; por ejemplo, los esporos de *B. subtilis* no la contienen (Setlow, 2014b) mientras que los de *B. cereus* tienen un exosporio muy desarrollado. En la actualidad se desconoce la función exacta de esta estructura (Setlow, 2006). Algunos esporos carentes de exosporio contienen una corteza externa (“crust”) de glicoproteínas (Kohler et al., 2017).

El “coat” del espora contiene diversas capas de estructura proteica que le permiten actuar como barrera y restringir el paso a gran cantidad de moléculas, como enzimas (Klobutcher, Ragkousi y Setlow, 2006; Setlow, 2014b) y sustancias químicas tóxicas, impidiéndoles acceder al interior del espora (Klobutcher, Ragkousi y Setlow, 2006).

Actualmente todavía se desconoce la función individual de muchas de las proteínas que componen esta capa (Setlow, 2006); aunque sabemos que la cubierta puede contener enzimas como la alanina racemasa o hidrolasas de la purina que regulan la germinación de los esporos (McKenney, Driks y Eichenberger, 2013), puesto que la alanina racemasa convierte la L-alanina en D-alanina inhibiendo por competición la germinación por L-alanina (Hitchins, 1968). Además, puede contener pigmentos que participan en la resistencia del espora a la radiación ultravioleta (McKenney, Driks y Eichenberger, 2013; Setlow, 2014b).

La siguiente barrera es la membrana externa que es fundamental para la formación del espora, aunque se desconoce su misión, si la tiene, en el espora ya formado. La estructura contiene pigmentos que podrían relacionarse con la resistencia a la radiación ultravioleta del espora (Setlow, 2014b).

Entre la membrana externa e interna, se encuentran dos capas compuestas por peptidoglicano: en la zona más externa el córtex y en la interna la pared celular; ambas son esenciales para la viabilidad y resistencia del espora a las agresiones físicas. Aunque ambas se componen de peptidoglicano, estructuralmente se diferencian por su grosor y grado de acetilación, que es mucho mayor en el córtex. El córtex es necesario para la reducción del contenido de agua del protoplasto en la fase de maduración del espora (Setlow, 2006), y, durante la germinación, su degradación es necesaria para permitir la expansión del protoplasto. La pared celular es semejante a la de las células vegetativas de las especies Gram-positivas y no se relaciona con las propiedades de resistencia del espora.

La membrana interna del espora es similar, en cuanto a la composición lipídica, a la membrana citoplasmática de las células vegetativas. Aunque presenta un estado de gel -semisólido-, lo que explica su baja permeabilidad, incluso al agua, la escasa movilidad de los lípidos y su alta viscosidad (Setlow, 2014b). A diferencia de la membrana externa, la interna actúa como barrera de permeabilidad protegiendo al espora de diversos agentes químicos (Setlow, 2006). Estas características se pierden durante la germinación (Setlow, 2014b).

En el centro del espora se encuentra el protoplasto que contiene enzimas, DNA, ribosomas y RNA, junto con otras moléculas específicas del espora bacteriano como el ácido dipicolínico (DPA) o pequeñas proteínas ácido-solubles (SASP).

El contenido de DPA del espora bacteriano supone aproximadamente un 10% del peso seco de los esporos de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*, encontrándose, en su mayoría, quelado con cationes divalentes de calcio (Setlow, 2003; 2014a). El compuesto es sintetizado por la célula madre durante la esporulación y se libera al principio de la germinación. El ácido dipicolínico favorece la reducción del contenido en agua del protoplasto lo que explica la elevada resistencia de estas estructuras a la radiación ultravioleta, los tratamientos térmicos, etcétera. El contenido en agua del espora, en peso húmedo, se encuentra entre un 27 y un 55%, mientras que en una célula vegetativa supone entre el 75-80% (Setlow, 2014a; 2014b).

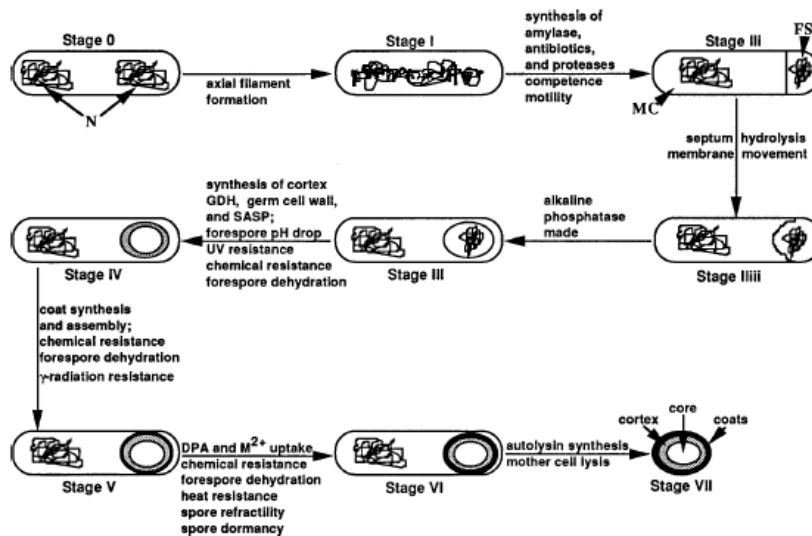
Además de por el bajo contenido en agua, el ADN está protegido frente a los agentes físicos y químicos por la presencia de SASP de tipo alfa y beta que se unen y saturan el cromosoma inmovilizándolo (Setlow, 2014b). Estas proteínas suponen entre un 3 y un 6 % del contenido proteico total del espora (Setlow, 2006) y son degradadas durante la fase de desarrollo (“outgrowth”).

## 1.2 Esporulación

La esporulación en *B. subtilis* se produce debido a la activación de sensores histidina kinasa que producen la fosforilación del factor regulador de la esporulación Spo0A (McKenney, Driks y Eichenberger, 2013). Este mecanismo parece ser común a la mayoría de las especies del género *Bacillus*. La esporulación es un proceso que puede durar tan solo 8 horas (Setlow y Jonhson, 2007) y se puede dividir en siete etapas, basándose en las características morfológicas celulares (Figura 2).

La primera etapa o fase cero se identifica con las células en crecimiento vegetativo convencional. La siguiente etapa, la fase I, se inicia con la elongación del cromosoma y la duplicación de la doble hélice, aunque el primer cambio morfológico apreciable en la célula es la división asimétrica del citoplasma, dando lugar al esporangio compuesto por la célula madre y el pequeño endospora separados por un septum (Setlow y Jonhson, 2007; McKenney, Driks y Eichenberger, 2013). Durante esta etapa, y debido a la separación entre las dos copias del cromosoma, se sospecha que la expresión genética de ambas podría ser diferente (Setlow y Jonhson, 2007). En las últimas etapas de la fase II se produce la síntesis de la fosfatasa alcalina (Setlow y Jonhson, 2007). En el siguiente estadio el endospora se invagina sobre la pared que le separa de la célula madre quedando rodeado por una doble membrana de polaridad inversa (McKenney, Driks y

Eichenberger, 2013). En la transición de la fase III a IV se forman en el endosporo, entre las dos membranas, el córtex de peptidoglicano acetilado y la pared celular. También se sintetizan las SASP y la glucosa deshidrogenasa. El resultado de estos cambios estructurales es que el esporo comienza a adquirir resistencia a la radiación ultravioleta y a algunos compuestos químicos (Setlow y Jonhson, 2007). En la última etapa del estadio III se produce una bajada del pH del protoplasto y comienza su deshidratación (Setlow y Jonhson, 2007). El “coat” se forma en el estadio IV, y en la fase V se sintetiza el DPA en la célula madre, que penetra, junto con diversos cationes, en el protoplasto del endosporo. La proporción final entre ambos es de 1:1. En esta fase, debido a la gran cantidad de sólidos en el protoplasto, se puede observar la refringencia de los esporos en un microscopio de contraste de fases (Setlow y Jonhson, 2007). Finalmente, en la fase VII se produce la síntesis de autolisinas en la célula madre que al actuar sobre sus membranas producen la liberación del esporo maduro (“dormant”, latente). Los esporos latentes han adquirido ya todas sus características y propiedades de resistencia frente a diversos agentes físicos y químicos.



**Figura 2.** Esquema del proceso de esporulación. La figura se ha obtenido de Setlow y Jonhson (2007).

### 1.3. Germinación

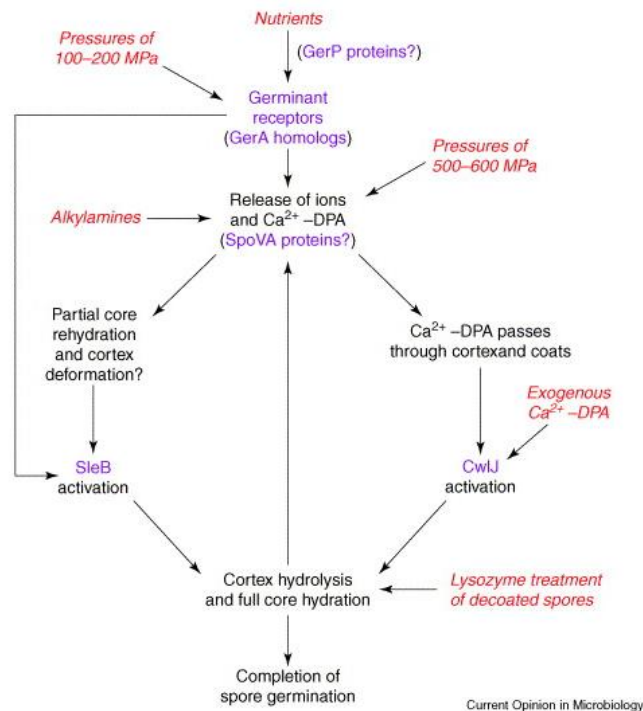
Los esporos bacterianos, una vez formados, son capaces de permanecer en ese estado de latencia durante decenas de años, hasta que en un momento determinado perciben un estímulo que induce su germinación, pudiendo, a partir de esta transformación, alterar los alimentos o causar enfermedades. Por tanto, la germinación podría definirse como el proceso de conversión de los esporos en células vegetativas



(Moir, 1990), lo que implica la aparición de actividad metabólica y la pérdida de resistencia a distintos agentes físicos y químicos.

La germinación en la naturaleza tiene lugar, principalmente, como respuesta a algunos nutrientes, denominados por ello germinantes nutritivos, que son específicos para cada especie y cepa bacteriana. Dentro de los germinantes nutritivos se encuentran diversos nutrientes, principalmente aminoácidos, azúcares y derivados de purina, aunque la germinación también puede ser inducida por una mezcla de varios, como la de asparagina, glucosa, fructosa y potasio (AGFK) (Yi y Setlow, 2010). También existen germinantes químicos no nutritivos como el dipicolinato cálcico (Ca-DPA), la lisozima, algunos peptidoglicanos y surfactantes catiónicos, como la dodecilamina. Entre los germinantes físicos se pueden encontrar, por ejemplo, las altas presiones y el calor (Setlow, 2014a). Cada uno de estos germinantes puede inducir la pérdida de latencia por diferentes vías (Figura 3). Otros factores ambientales como el pH o la temperatura pueden afectar a la respuesta de los esporos a los distintos germinantes, variando los rangos óptimos entre especies.

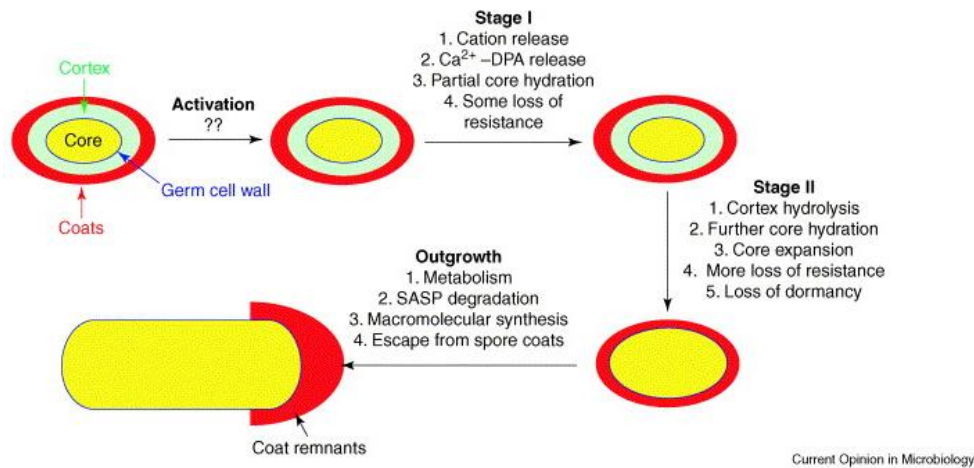
El proceso de germinación está relacionado con proteínas específicas del espora, ligadas en su mayoría a la membrana interna. En el proceso de germinación con nutrientes los germinantes deben atravesar las capas externas del espora y alcanzar la membrana interna donde se unen a los receptores de la germinación (GR) (Setlow, 2003). Existen diversas proteínas que actúan como GR en la membrana interna; por ejemplo, en *B. subtilis* se ha demostrado que la proteína GerA es un receptor que reconoce a la L-alanina, mientras que para reconocer la mezcla AGFK son necesarias las proteínas GerB y GerK (Setlow, 2003). Las altas presiones son capaces de inducir la germinación de esporos bacterianos a través de dos mecanismos diferentes: a presiones de entre 50 y 350 MPa inducen la germinación activando los GRs; a presiones superiores la germinación es inducida a través de la liberación de iones y Ca-DPA; y a presiones superiores a 600 MPa la germinación se induce a través de la activación de los enzimas líticos del córtex (CLEs, tanto SleB como CwlJ) (Setlow, 2003; Zhang y Mathys, 2019).



**Figura 3.** Mecanismos de germinación de diferentes. La figura se ha obtenido de Setlow (2003).

La germinación de los esporos puede ser dividida en cuatro etapas: la activación, la fase I, la fase II y, por último, la fase de desarrollo u “outgrowth” (Figura 4).

Algunos esporos de las suspensiones son incapaces de germinar en presencia de nutrientes: son los denominados esporos superlatentes. Para que estos esporos inicien la germinación es necesario que primero sean activados. En la actualidad no se sabe realmente que cambios se producen durante la activación (Setlow, 2003), y simplemente se define como un cambio que pone a los esporos en “disposición de germinar”. Alternativamente se denomina también como activación al periodo de tiempo desde que se añade el germinante hasta que se inicia la germinación. La activación de los esporos bacterianos es una etapa fundamental previa a su destrucción. De hecho, se cree que la eliminación de esporos que no han sido previamente activados es prácticamente imposible, al menos por métodos físicos. Dada su indefinición, algunos investigadores identifican la activación con la fase I de germinación, aunque la activación se diferencia de la germinación por ser un proceso reversible.



**Figura 4.** Esquema general de la germinación de los esporos bacterianos. La figura se ha obtenido de Setlow (2003).

Tras la activación de los esporos y producirse la unión del germinante con el receptor GR específico, el esporo llega a un “estado de compromiso (commitment)” que conduce a la germinación; es decir, una vez iniciada la germinación el proceso ya es irreversible, incluso tras retirar el germinante del medio (Yi y Setlow, 2010).

En la fase I de la germinación se produce la liberación de hidrogeniones, otros cationes monovalentes y zinc; en segundo lugar, la liberación de DPA y cationes divalentes de calcio, asociados formando dipicolinato de calcio; y, en último lugar, el reemplazo del DPA por agua (Setlow, 2003). Además, en el estadio I se produce, debido a la entrada de agua, un aumento del tamaño del esporo, su pérdida de refringencia y una disminución de la resistencia al calor y otros agentes físicos (Setlow, 2003). La liberación de cationes y de DPA durante la fase I de germinación se ha relacionado con la presencia de canales en la membrana interna que serían los responsables del transporte activo (Setlow, 2003). 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, 2014a).

En el siguiente estadio se produce la hidrólisis del córtex, lo que produce la descompresión del protoplasto y su rehidratación (Setlow, 2003). La hidratación del protoplasto en la fase II facilita la movilidad de las proteínas, y así el inicio del metabolismo. 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). Los esporos mutados que carecen de ambas enzimas no pueden pasar del estadio I de la germinación (Setlow, 2003). Tras la degradación del córtex, se produce el deplegamiento de la membrana interna y la expansión e hidratación del protoplasto. Al final del estadio II el contenido de agua del protoplasto del esporo germinado es un 80% del peso húmedo, es decir, similar al contenido de las células vegetativas (Setlow, 2014a; 2014b). Este contenido de agua permite el inicio de un metabolismo activo con la síntesis de compuestos macromoleculares y la consiguiente transformación de las estructuras durante el “outgrowth”.

El “outgrowth” es la etapa final de la germinación durante la cual se produce la síntesis de lípidos, DNA, RNA y proteínas, así como el crecimiento celular. Lógicamente esta etapa es sensible a los inhibidores de la síntesis macromolecular (Moir, 1990). 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 fosfoglicérido, que se usarán como fuentes de energía (Moir y Cooper, 2015); y se repara el DNA. Aunque esta actividad metabólica se inicia muy rápidamente -en los primeros minutos del “outgrowth”-, la replicación no se inicia hasta 60 minutos después (Setlow y Johnson, 2007).

Como se desprende del resumen anterior, la germinación es un proceso extraordinariamente complejo incluso cuando es inducido por nutrientes. Esta complejidad tiene como consecuencia una enorme variabilidad individual que se manifiesta en la práctica con una amplia heterogeneidad en los ritmos de germinación. Esta heterogeneidad explica el que desde que el esporo entra en contacto con el germinante hasta que se produce la germinación transcurra un tiempo que puede oscilar desde unos pocos minutos hasta 24 horas. Los tratamientos térmicos subletales inducen la activación de esporos acelerando el proceso de germinación. La temperatura óptima de choque térmico para la activación de los esporos es característica de la especie, siendo mayor para las más termorresistentes y para los esporos superlatentes se necesitan temperaturas mayores. Otros mecanismos de activación de esporos pueden ser pHs bajos o el uso de diversas sustancias químicas.

## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El desarrollo cultural y económico de las últimas décadas ha dado lugar a la aparición de una demanda constante y creciente por parte de la sociedad de alimentos de mayor calidad. Además, la globalización del mercado exige productos con una vida útil más prolongada. La Tecnología de los Alimentos está desarrollando diversos enfoques para satisfacer esta demanda, entre los que destaca la puesta a punto de nuevas estrategias y métodos de conservación de los alimentos. Para conseguir este propósito y garantizar el suministro de productos estables y seguros es necesario garantizar el control de microorganismos patógenos y alterantes, siendo los esporos bacterianos uno de los principales problemas al que se enfrenta la industria agroalimentaria actual. Dado que al iniciarse la germinación se produce una pérdida de resistencia de los esporos a las agresiones físicas y químicas resulta especialmente relevante conocer los mecanismos de germinación.

La investigación realizada se encuadra dentro del proyecto de investigación AGL 2015-69565-P, titulado: búsqueda de estrategias de conservación de alimentos que aseguren la inactivación de los microorganismos más resistentes.

Nuestra hipótesis de trabajo es que no es necesario revertir los esporos al estado vegetativo, sino que simplemente forzando el inicio de la germinación (fases I y II) se producirá una caída de resistencia suficiente para suavizar la intensidad de los tratamientos, consiguiendo alimentos seguros, estables, y de mayor calidad que los actuales.

En otros trabajos complementarios el esfuerzo se ha focalizado en los esporos superlatentes, mientras que en este pretendemos estudiar la germinación de esporos latentes. El objetivo de este trabajo es caracterizar la germinación y la pérdida de resistencia de una suspensión de esporos latentes sometidos a distintas tecnologías. Para la consecución de este objetivo general será necesario realizar las siguientes actividades:

1. Seleccionar una especie para el estudio.
2. Caracterizar el ritmo de germinación de los esporos sometidos a distintos tratamientos.
3. Estudiar la resistencia de los esporos en distintas fases de germinación.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Esporulación en medio líquido y recuperación en medio sólido

La cepa de *B. weihenstephanensis* fue suministrada por el Prof. J. Ling de la universidad de Dublín. Para su revitalización se inocularon placas de agar nutritivo (Oxoid, Madrid, España) enriquecido con un 0,6% (p/v) de extracto de levadura (Oxoid) (ANYE) por agotamiento en estría y se incubaron a 25°C durante 24 horas. El precultivo se preparó inoculando una colonia en 10 mL de caldo nutritivo (CN; Oxoid) e incubando 24 horas a 25°C. Este precultivo se utilizó para sembrar el medio de esporulación (caldo nutritivo ZEU desarrollado por ZEULAB (Zaragoza, España), enriquecido con MnSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub>). Para favorecer la esporulación el cultivo se mantuvo en agitación a 130 r.p.m. (Vibramax100, Heidolph Instrument, Acwabach, Alemania) en una estufa de aire forzado a 25°C. El porcentaje de esporulación se cuantificó comparando los recuentos en ANYE antes y después de una pasteurización a 75°C durante 10 minutos. Las cepas de *B. subtilis* y *B. coagulans* fueron suministradas por la colección española de cultivos tipo (CECT). Las suspensiones se prepararon según se ha descrito con la salvedad de que las incubaciones se realizaron a 30°C. Todas suspensiones obtenidas se centrifugan a 4.000g 15 minutos a 4°C (MiniSpinPlus, Eppendorf, Hamburgo, Alemania), se resuspendieron en agua destilada estéril y se almacenaron en refrigeración a 4°C.

Todos los recuentos se realizaron en agar nutritivo enriquecido con 0,6 % (p/v) de extracto de levadura (Oxoid) y, posteriormente, las placas eran incubadas a 25°C durante 48 horas para *B. weihenstephanensis* y a 30°C durante 24 horas para *B. coagulans* y *B. subtilis*. Una vez incubadas las placas, se realizaba 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).

#### 3.2 Germinación con aminoácidos

Para evaluar la velocidad de germinación por germinantes nutritivos se utilizaron: caldo nutritivo (CN) y soluciones acuosas de L-alanina 50 mM, inosina 5 mM, L-alanina 50 mM e inosina 5 mM, y una combinación de 2,5 mM de asparagina, 5,55 mM de glucosa, 5,55 mM de fructosa y 44 mM de cloruro potásico. El ritmo de germinación se siguió a lo largo de 24 horas de incubación, en agitación a 130 r.p.m., a 25°C para *B. weihenstephanensis* y a 30°C para *B. subtilis* y *B. coagulans*. Para evaluar la magnitud de

la germinación se compararon los resultados antes (AP) y después de pasteurizar (DP) (75°C 10 minutos) (Hitchins, 1968).

### 3.3 Elaboración de curvas de crecimiento

Para elaborar las curvas de crecimiento se extrajeron alícuotas de 0,1 mL a intervalos predeterminados de tiempo y se sembraron en agar nutritivo enriquecido con 0,6% (p/v) de extracto de levadura por homogeneización en masa. Además, se hicieron recuentos después de pasteurizar (75°C 10 minutos) para conocer la cantidad de esporos presentes. Las curvas de crecimiento obtenidas se ajustaron, para obtener los parámetros cinéticos, con la ecuación de Gompertz (Ecuación 1) (Gayán, 2013):

$$\text{Ecuación 1:} \quad \text{Log } N_t = N_0 + C \times e^{\{-e^{[-B(t-M)]}\}}$$

Dónde:  $N_t$  es el número microorganismos al tiempo  $t$  (UFC/mL);  $N_0$  es el recuento inicial de microorganismos (UFC/mL);  $C$  es el Log del recuento en la fase estacionaria –  $\text{Log } N_0$  (ciclos de incremento en el recuento);  $M$  es el tiempo al cual el cultivo alcanza su máxima velocidad de crecimiento (horas);  $B$  es la velocidad de crecimiento relativo en el punto  $M$  (1/horas).

### 3.4 Germinación y dipicolinato cálcico

Con el objetivo de evaluar la presencia de esporos superlatentes en la suspensión de esporos se trató la suspensión con dipicolinato cálcico (60 mM de ácido dipicolínico y 60 mM de  $\text{CaCl}_2$ ) a pH de 8 (Paidhungat, Ragkousi y Setlow, 2001; Magge et al., 2008).

También se estudió la cantidad de DPA presente en los esporos; para ello se elaboró una curva de calibración del ácido dipicolínico para establecer el rango de concentraciones en que su relación con la absorbancia era lineal. Con el objetivo de conocer la cantidad total de DPA presente en los esporos se esterilizaron (121°C 20 minutos) diferentes concentraciones de esporos y, posteriormente, se centrifugó durante 2 minutos a 12 r.p.m. en la microcentrífuga y se determinó el contenido de DPA liberado midiendo la absorbancia del sobrenadante a 270 nm en un espectrofotómetro (Libra S12, Biochrom, Cambridge, UK) (Setlow, Cowan y Setlow, 2003; Krawczyk et al., 2016).



### 3.5 Germinación inducida por altas presiones

Con el propósito de conocer el efecto de la germinación física, se sometió a los esporos de *B. weihenstephanensis* a tratamientos a 400 MPa a temperatura ambiente durante 20 minutos en tampón citrato-fosfato McIlvaine pH 7.

Los tratamientos se aplicaron en un equipo Micro FoodLab FPG 5740 suministrado por Stansted Fluid Power, LTD (Stansted, UK), según se ha descrito previamente (Ramos et al., 2015).

### 3.6 Germinación inducida con HCl y NaOH

Para comprobar el efecto del pH en la germinación se trataban los esporos con HCl 1N a 30°C durante 70 minutos y NaOH 1N a 25°C durante 2-3 horas (Setlow et al., 2002) realizando recuentos a tiempos previamente establecidos. Además, para determinar la magnitud de la germinación, se monitorizó la salida de ácido dipicolínico a 270 nm (Setlow, Cowan y Setlow, 2003).

Tras los tratamientos se sembró en agar nutritivo con extracto de levadura (ANYE). En ocasiones antes de la siembra se realizó un pretratamiento en lisozima (1,35 microgramos/mL) disuelta en una solución acuosa 0,14N de cloruro sódico. Tras aplicar el tratamiento durante 15 segundos, se neutralizaba con tampón fosfato salino (PBS) y se sembraba por homogeneización en masa. Ocasionalmente también se pretrataron con dipicolinato cálcico 60 mM a 30°C durante 90 minutos (Paidhungat, Ragkousi y Setlow, 2001; Magge et al., 2008; Krawczyk et al., 2016).

### 3.7 Tratamientos térmicos

Las determinaciones de termorresistencia se realizaron en un termorresistómetro TRSC (Condón, Arrizubieta y Sala, 1993). El equipo está compuesto por una cámara de tratamiento de acero inoxidable de 450 mL de capacidad que contiene el medio de tratamiento. La cámara de tratamiento contiene diferentes elementos necesarios para su adecuado funcionamiento: una resistencia eléctrica de 1.200 W, que permite el calentamiento del medio, una sonda termopar (Crison, Thermometer 639K, Crison Instruments S.A., Alella, España) que controla la temperatura, la velocidad de calentamiento, etc. y un sistema de refrigeración, compuesto por un serpentín de acero inoxidable. Además, está dotado de un sistema de agitación que asegura una distribución homogénea de la temperatura y del inóculo en la cámara. El equipo contiene también una



entrada de presión, para trabajar a temperaturas superiores a las de ebullición del medio, un dispositivo de inyección, y un sistema de extracción de muestras conectado a una válvula solenoide que permite la toma de muestra.

Antes y después de la utilización del termorresistómetro se esterilizaba el equipo junto con el medio de tratamiento (tampón McIlvaine pH 7) a 121°C durante 20 minutos. Una vez estéril, se estabilizaba a la temperatura de tratamiento y se inyectaban 0,2 mL de la suspensión microbiana con una jeringuilla desechable.

Para la determinación de la termorresistencia de células vegetativas se utilizaron temperaturas de tratamiento de: 56°C, 58°C, 60°C y 62°C, mientras que para la determinación de termorresistencia de esporos en condiciones isotérmicas se usaron: 95°C, 97,5°C, 100°C y 102,5°C. Para determinar la termorresistencia en fases intermedias de germinación se trataban los esporos a 30°C durante 10 minutos en HCl 1N y, posteriormente, se inoculaban 0,2 mL en el termorresistómetro realizando tratamientos a 70°C, 75°C y 80°C. A periodos predeterminados de tiempo se extraían las muestras de 0,2 mL directamente a placa Petri estéril.

### 3.8 Cálculo de los parámetros de resistencia y análisis estadístico de los datos

Una vez se obtuvieron los recuentos se elaboraron las gráficas de supervivencia representando la fracción de supervivientes ( $\log N/N_0$ ) frente al tiempo de tratamiento (minutos). Posteriormente, se calcularon los parámetros  $D_T$  para cada temperatura y se obtuvieron las curvas de termodestrucción, representando el logaritmo del valor  $D_T$  frente a la temperatura, y se calculó el valor  $z$ .

Los análisis estadísticos de los resultados, las medias y las desviaciones estándares fueron realizados con el programa informático Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Co., Washington, EE. UU.) y las gráficas presentadas en este trabajo se han realizado con el programa GraphPad PRISM5® (GraphPad Software, California, EE. UU.).

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se pretendía ahondar en el conocimiento de los ritmos de germinación de esporos latentes de especies de aerobios esporoformadoras y de su pérdida de resistencia al estrés. Para ello se consideró necesario seleccionar una especie adecuada para el estudio, caracterizarla y estudiar su resistencia en distintas fases de germinación.

##### 4.1 Selección de la especie objeto de estudio

Como previamente hemos descrito, el objetivo de este trabajo exigía la elección de una población bacteriana en la que el número de esporos latentes, capaces de germinar en medios nutritivos convencionales, y por tanto alcanzar la fase I de germinación, fuese elevado. Por ello, procedimos a estudiar los ritmos de germinación de tres suspensiones de esporos con distintas características fisiológicas para, finalmente, seleccionar la especie con menor porcentaje de esporos superlatentes y que mayor interés pudiese tener para la industria alimentaria actual. Inicialmente estaba previsto incluir en el cribado a *G. stearothermophilus*, pero otros trabajos realizados paralelamente en nuestro grupo indicaban que esta especie producía normalmente un porcentaje de hasta el 90% de esporos superlatentes por lo que se descartó. Finalmente decidimos estudiar: *B. coagulans*, por ser una especie capaz de crecer en un amplio rango de temperaturas y pHs; *B. subtilis*, por ser la especie de la familia *Bacillaceae* mejor conocida; y *B. weihenstephanensis*, por ser una especie patógena emergente y psicrotrofa.

La estrategia desarrollada para este estudio consistió en someter a las suspensiones de esporos a los germinantes químicos mejor conocidos (L-alanina 50 mM, inosina 5 mM y una combinación de L-alanina 50 mM e inosina 5 mM), y a una mezcla de nutrientes inespecífica (caldo nutritivo), durante periodos variables de tiempo, y estudiar los ritmos de germinación. Para distinguir entre células germinadas y esporos decidimos realizar los recuentos antes y después de una pasteurización a temperaturas tales que se inactivasen las células vegetativas, pero no los esporos; así, por diferencia entre ambos recuentos, podríamos determinar el porcentaje de germinación. Los tiempos y temperaturas de pasteurización para diferenciar entre células vegetativas y esporos difieren mucho en la bibliográfica. Tras realizar diversas pruebas optamos por utilizar un tratamiento de 75°C durante 10 minutos. Una vez establecido el protocolo de trabajo procedimos a estudiar el ritmo de germinación con los distintos germinantes. La Tabla 1 muestra los resultados

obtenidos con la solución acuosa de L-alanina 50 mM, inosina 5 mM y la mezcla L-alanina 50 mM e inosina 5 mM para las tres especies estudiadas.

**Tabla 1.** Porcentaje de germinación de *B. subtilis* a 30°C, *B. coagulans* a 30°C y *B. weihenstephanensis* a 25°C en soluciones acuosas de L-alanina 50 mM, inosina 5 mM y una combinación de L-alanina 50 mM e inosina 5 mM.

Microorganismo	Tiempo (minutos)	% Germinación en L-alanina 50 mM	% Germinación en inosina 5 mM	% Germinación en L-alanina 50 mM + inosina 5 mM
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0,0 (±17,0)	0,0 (±8,0)	0,0 (±24,2)
	10	0,0 (±16,7)	0,0 (±23,4)	0,0 (±19,2)
	30	0,0 (±18,6)	0,0 (±15,9)	0,0 (±7,7)
	60	0,0 (±19,4)	0,0 (±29,4)	15,0 (±8,7)
	120	56,2 (±6,4)	0,0 (±20,7)	41,0 (±4,9)
	180	30,6 (±3,1)	0,0 (±4,5)	35,0 (±4,4)
	1440	0,0 (±19,8)	14,6 (±42,8)	18,0 (±1,8)
<i>Bacillus coagulans</i>	0	50,9 (±11,5)	63,8 (±14,1)	66,8 (±9,2)
	10	63,0 (±9,2)	66,4 (±11,8)	70,0 (±10,0)
	30	67,0 (±8,1)	66,2 (±14,6)	71,0 (±7,4)
	60	68,0 (±10,4)	61,3 (±11,6)	74,8 (±6,7)
	120	72,2 (±9,8)	61,6 (±13,6)	83,0 (±4,9)
	180	82,8 (±7,6)	68,7 (±17,5)	88,9 (±4,8)
	1440	96,4 (±1,6)	73,5 (±17,5)	96,1 (±2,0)
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	0	18,8 (±6,1)	18,2 (±9,2)	19,4 (±0,3)
	10	22,0 (±8,4)	15,0 (±13,2)	49,3 (±14,0)
	30	14,8 (±3,4)	16,6 (±16,5)	60,4 (±0,9)
	60	44,9 (±11,1)	27,7 (±16,5)	85,1 (±10,1)
	120	31,9 (±0,6)	21,1 (±0,6)	77,0 (±7,3)
	180	43,9 (±1,4)	18,5 (±9,1)	80,0 (±5,1)
	1440	33,9 (±18,0)	44,9 (±15,5)	79,7 (±10,9)

A juzgar por nuestros resultados, la L-alanina 50 mM no actúa como germinante, durante la primera hora de tratamiento para *B. subtilis*. Como se observa en la tabla 1 el porcentaje de germinación aumenta tras 2 horas en contacto con el germinante y disminuye de nuevo a las 3 horas. Estos resultados difieren de los obtenidos por Alzahrani y Moir (2014) que observaron, para todas las cepas de *B. subtilis* que aparecen en su estudio, que solamente es necesaria una concentración de 20 mM a 37°C para inducir la germinación de la mayor parte de la población en menos de 1 hora. Esta diferencia de comportamiento puede ser debida a las características fisiológicas de nuestra cepa. A juzgar por los datos publicados este resultado parece indicar que nuestra cepa de *B. subtilis* podría contener el enzima alanina racemasa que, como ya se ha comentado en la introducción, puede inhibir por competición la germinación por L-alanina (Hitchins, 1968; Gounina-Allouane, Broussolle y Carlin, 2008). La L-alanina actúa eficazmente

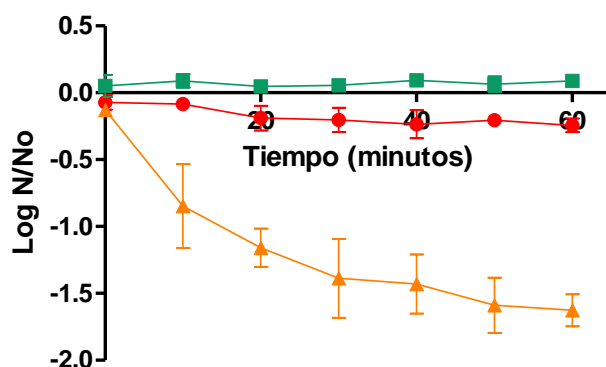
como germinante nutritivo para *B. coagulans*, que alcanza un porcentaje de germinación del 82,8% de los esporos de la suspensión en tres horas aproximadamente. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Hitchins (1968), que observó un 99% de germinación a concentraciones entre 10 y 100 mM. Al contrario que para esta especie la L-alanina resultó un germinante poco eficaz para *B. weihenstephanensis*, puesto que menos del 50% de la población germinó en el tiempo objeto de estudio.

La inosina es un germinante nutritivo ampliamente utilizado por los investigadores. Para *B. subtilis* la inosina 5 mM no actúa como germinante durante las primeras tres horas de tratamiento; sin embargo, a las 24 horas induce la germinación del 14% de la población, aproximadamente. Según Gounina-Allouane, Broussolle y Carlin (2008) la inosina a concentraciones de entre 0,05 y 10 mM induciría la germinación, del 50% y 70%, respectivamente, de *B. subtilis* en dos horas de tratamiento. Este comportamiento frente a los dos germinantes más eficaces para los esporos del género *Bacillus* indican que nuestra cepa es especialmente poco sensible a los germinantes nutritivos, lo que podría ser debido a un bajo número de receptores de la germinación (Setlow, 2014a). La incubación en presencia de inosina produce la germinación del 63,8% de la población de *B. coagulans*, de manera prácticamente instantánea. La inosina 5 mM no es tampoco un germinante eficaz para *B. weihenstephanensis*, ya que tras 24 horas más de la mitad de la población no germinó.

Debido a la creciente importancia de los co-germinantes, decidimos también estudiar el efecto en la velocidad de germinación de una combinación de L-alanina e inosina. De nuevo, la combinación L-alanina 50 mM e inosina 5 mM no induce eficazmente la germinación de *B. subtilis*, aunque se incrementa el porcentaje de germinación tanto a las 3 horas como a las 24 con respecto a la presencia de los nutrientes separadamente. Según hemos indicado previamente, la actividad alanina racemasa podría inhibir la germinación o un exceso de molaridad. Por el contrario, la combinación de estos nutrientes produce una germinación, en 24 horas, para *B. coagulans* del 96,1% de la población. Los resultados obtenidos parecen indicar que la inosina 5 mM no actuaría para este microorganismo como un co-germinante. En el caso de *B. weihenstephanesis* la combinación de L-alanina 50 mM e inosina 5 mM induciría la germinación a las 24 horas del 79,7% de la población, ambos nutrientes por separado tienen poco efecto en el porcentaje de germinación, mientras que su combinación la favorece. Este

comportamiento ha sido observado también en otros microorganismos formadores de esporos, como *B. anthracis* (Ireland y Hanna, 2002).

Según hemos indicado en la introducción, al margen de los germinantes hasta aquí estudiados, se sospecha que también otros nutrientes o sus combinaciones pueden inducir la germinación, aunque por el momento no están bien definidos. Por ello decidimos estudiar el ritmo de germinación de estas especies en un medio de cultivo rico en nutrientes, como el caldo nutritivo. La figura 5 muestra los resultados obtenidos.



**Figura 5.** Curvas de ritmo de germinación de *B. coagulans* (●) a 30°C, *B. subtilis* (■) a 30°C y *B. weihenstephanensis* (▲) a 25°C en caldo nutritivo, realizando recuento a diferentes tiempos antes y después de pasteurizar.

En la figura 5 se puede apreciar que el caldo nutritivo no induce la germinación en *B. subtilis* en las tres primeras horas, sin embargo, a las 24 horas se alcanzó un 50,5% de germinación (datos no mostrados). En definitiva, el caldo nutritivo es un inductor de la germinación más eficaz que los nutrientes cuyos receptores de la germinación se conocen. Alternativamente es posible que el caldo nutritivo pueda inducir la germinación a través de otros mecanismos diferentes a los considerados en este apartado.

Para *B. coagulans* se puede observar, una disminución del  $\log N/N_0$ , lo que parece indicar que actúa como germinante nutritivo para esta especie. Sin embargo, el recuento a partir de las 3 hasta las 24 horas se mantiene constante, lo que indica que solo un porcentaje de la población, aproximadamente un 46,9%, responde a este estímulo. Este porcentaje de germinación es inferior al obtenido en presencia de L-alanina 50 mM y en la combinación L-alanina e inosina. Hitchins (1968), utilizando caldo nutritivo con glucosa y extracto de levadura a 37°C, observó una rápida germinación del 95% de la población de *B. coagulans* en menos de 1 hora, y pasadas las 5 horas de tratamiento del 99,9%.

Para *B. weihenstephanensis* se puede observar una mayor disminución del Log N/N<sub>0</sub>, lo que indica que el caldo nutritivo actúa como agente germinante con más eficacia que la L-alanina y la inosina. Además, a las 24 horas de tratamiento se aprecia que un 99,8% de la población ha germinado en caldo nutritivo por lo que, en el caso de que haya esporos superlatentes estos supondrían tan solo un 0,2% de la población.

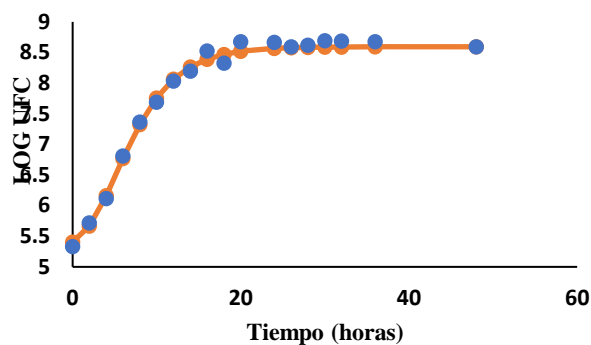
Tras el estudio de la velocidad de germinación de las tres especies con los distintos nutrientes se seleccionó como microorganismo objeto de estudio *B. weihenstephanensis*, debido a su elevada velocidad de germinación en caldo nutritivo. Además, el porcentaje de esporos germinados es mucho mayor que en el resto de las especies estudiadas, alcanzando un porcentaje de germinación del 99,8% de la población que habitualmente crece en placa. Posteriormente, se comprobó microscópicamente, haciendo uso de la cámara de Thoma, que el número de esporos latentes totales presentes en la suspensión, suponía, aproximadamente, entre un 93 y un 95% de la población siendo, por tanto, la especie que mejor se ajustaba a las exigencias de nuestro estudio.

#### 4.2 Caracterización de *B. weihenstephanensis*

Una vez elegida la especie a estudiar, procedimos a la caracterización de la cepa. Con este propósito elaboramos su curva de crecimiento y el ritmo de esporulación en las condiciones de referencia. Posteriormente ahondamos en el conocimiento del ritmo de germinación de esta especie por distintas rutas.

##### 4.2.1. Crecimiento y esporulación

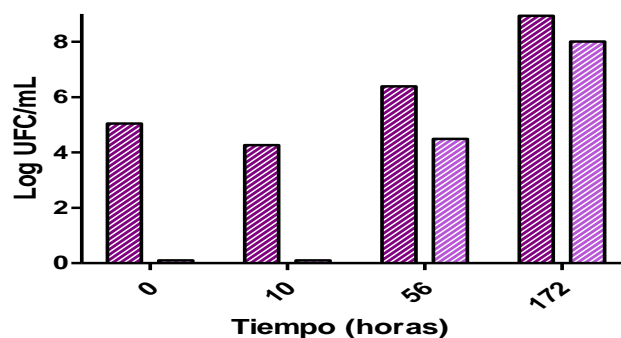
Es importante conocer la curva de crecimiento en las condiciones habituales de cultivo dado que, como es bien sabido, la entrada en fase estacionaria de crecimiento desencadena la expresión de los factores sigma que confieren resistencia a las células y cambian su actividad metabólica. Estos cambios pueden ser responsables de la aparición de colas en las gráficas de supervivencia cuando coexisten células en fase logarítmica y estacionaria de crecimiento. La figura 6 muestra la curva de supervivencia obtenida al cultivar las células en caldo nutritivo a 25°C.



**Figura 6.** Curva de supervivencia obtenida al cultivar las células en caldo nutritivo a 25°C y modelizada con el modelo Gompertz (Gayán, 2013).

Tal como muestra la figura 6, tras una pequeña fase de latencia se alcanza rápidamente la fase estacionaria de crecimiento y transcurridas 20 horas, aproximadamente, la fase estacionaria. La curva de crecimiento fue ajustada con el modelo de Gompertz para obtener los parámetros cinéticos de crecimiento (Fase de latencia= 1,32 horas; tiempo de duplicación= 0,74 horas; recuento máximo= 8,59). La siembra de estas mismas muestras tras una pasteurización a 75°C durante 10 minutos nos permitió observar que la esporulación comenzaba pasadas 28 horas, si bien es cierto que en 50 horas la población de esporos no llegaba a alcanzar el 0,01% de la población. No obstante, la presencia de esporos en la suspensión podría dificultar la interpretación de las gráficas de supervivencia de las células vegetativas frente a diversas tecnologías, por lo que se estableció como tiempo máximo de cultivo 24 horas.

Cuando se pretenden obtener suspensiones abundantes y homogéneas de esporos suelen utilizarse medios especiales. En nuestro caso optamos por utilizar un caldo suministrado por Zeulab. El medio se prepara diluyendo un caldo nutritivo convencional y añadiendo diversas sales minerales: sulfato de manganeso, cloruro cálcico y cloruro de magnesio. La figura 7 muestra las curvas de crecimiento y de esporulación de nuestra cepa a 25°C en el medio Zeulab.



**Figura 7.** Curvas de crecimiento y de esporulación a 25°C de *B. weihenstephanensis* en caldo Zeulab enriquecido con MnSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub>. Recuentos antes (hatched) y después (solid purple) de pasteurizar a 75°C durante 10 minutos.

Como se puede observar en la figura 7 la velocidad de crecimiento de las células vegetativas es muy inferior al observado en caldo nutritivo, sin embargo, el ritmo de germinación es mayor y tras una semana de incubación se alcanzaba una concentración de  $1,01 \times 10^8$  esporos/mililitro. Este ritmo de esporulación es sensiblemente inferior al de otras especies del género *Bacillus* (Piggot y Hilbert, 2004; Ryu, Kim y Beuchat, 2005) lo que sin duda se debe a que, dada su psicofilia, se incubó a una temperatura relativamente baja.

#### 4.2.2. Ritmo de germinación de *B. weihenstephanensis*

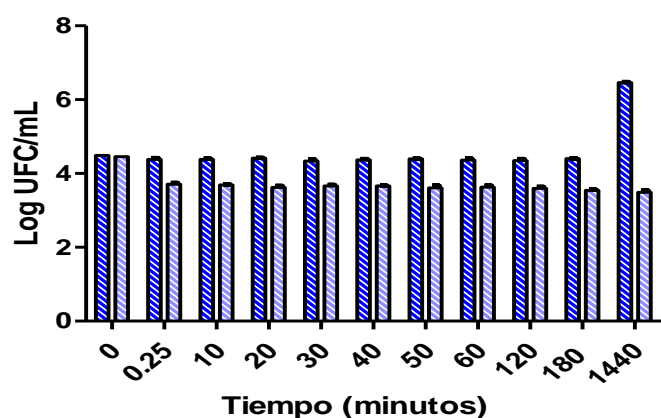
Según hemos indicado en la introducción, además de los germinantes nutritivos existen otros estímulos de naturaleza diversa que pueden inducir la germinación de los esporos bacterianos. En esta fase de la investigación decidimos estudiar como respondían los esporos de *B. weihenstephanensis* a estos estímulos.

##### 4.2.2.1. Germinación con AGFK

En el apartado 4.1 se estudió la respuesta a los germinantes nutritivos más usuales de *B. weihenstephanensis* con el fin de compararla con la de otras especies. De esa investigación se concluyó que esta especie respondía mal a la L-alanina, a la inosina y a sus mezclas; por el contrario, su suspensión en caldo nutritivo inducía la germinación de una fracción mayoritaria de la población. Este comportamiento podría ser debido al efecto sinérgico de diversos componentes del caldo nutritivo por lo que decidimos comprobar este extremo. La combinación de asparagina, glucosa, fructosa y cloruro potásico (AGFK) ha sido descrita como un potente germinante de *B. subtilis* (Wax y



Freese, 1968), por lo que se decidió estudiar su efecto en *B. weihenstephanensis*. La figura 8 resume los resultados obtenidos.



**Figura 8.** Germinación de *B. weihenstephanensis* en una solución acuosa de asparagina (2,5 mM), glucosa (5,55 mM), fructosa (5,55 mM) y cloruro potásico (44 mM). Realizando recuentos a diferentes tiempos antes (▨) y después (■) de pasteurizar.

Tal y como se puede observar en la figura 8 la mezcla de AGFK es un germinante casi instantáneo (menos de 15 segundos) para el 81,8% de la población de *B. weihenstephanensis*. A las 3 horas se ha producido la germinación del 85,8% de la población y este porcentaje de germinación se mantiene prácticamente constante a las 24 horas. De estos datos se deduce que hay un porcentaje de la población, de aproximadamente un 14,2%, que no responde al AGFK pasadas 24 horas. El incremento de recuento a las 24 horas antes de pasteurizar sin duda se debe a la multiplicación de los esporos previamente germinados.

Yi et al. (2011) sugieren que la germinación debida a una combinación de germinantes, como es la mezcla de AGFK, se debe a la activación de diferentes GRs, y que el tiempo de germinación depende del número de GRs activados. La heterogeneidad en la germinación inducida por la combinación AGFK en *B. weihenstephanensis* podría ser la consecuencia de una distribución no homogénea de GRs en la población.

#### 4.2.2.2. Germinación y dipicolinato cálcico

Según indicábamos en la introducción, la fase II de la germinación consiste en la activación de los enzimas líticos del córtex al unirse al ácido dipicolínico. Se ha demostrado que en determinadas circunstancias la adición de DPA induce la germinación directa de los esporos sin pasar por las fases de activación y fase I. Si la adición de DPA exógeno induce la germinación quiere decir que los esporos poseen una carga enzimática

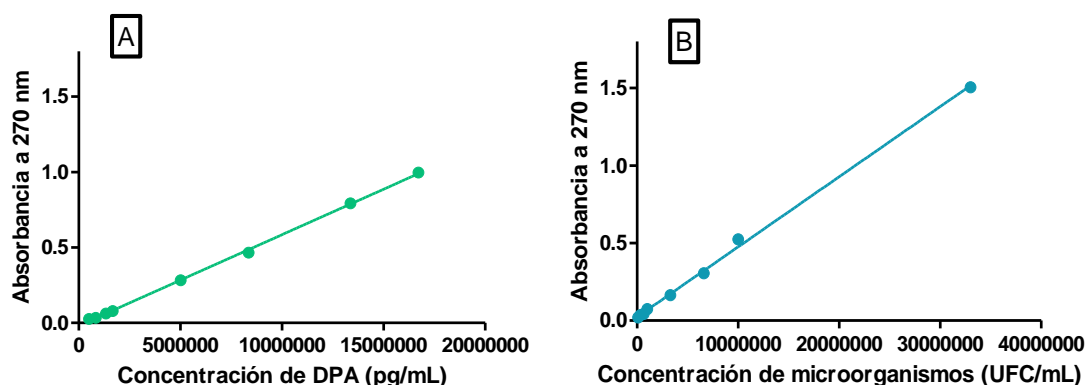
adecuada para lisar el córtex, en caso contrario se puede deducir que la imposibilidad de germinar se debe a la inexistencia de estas enzimas. En esta parte de la investigación estudiamos la respuesta de nuestra suspensión de *B. weihenstephanensis* al dipicolinato cálcico. El experimento consistió en suspender los esporos en una solución acuosa de dipicolinato cálcico 60 mM y extraer muestras cada 15 minutos hasta completar dos horas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $>0,05$ ) entre los recuentos obtenidos en presencia y ausencia de Ca-DPA para ninguno de los tiempos investigados (datos no mostrados). Estos resultados implican que los esporos de esta especie contienen la cantidad suficiente de DPA en su protoplasto para activar los enzimas líticos. Otros autores han demostrado que la exposición a Ca-DPA 60 mM aumenta el porcentaje de esporos capaces de germinar, lo que se ha relacionado con la activación de esporos superlatentes (Paidhungat, Ragkousi y Setlow, 2001; Magge et al., 2008; Ghosh y Setlow, 2009). Sería esperable que la adición de DPA indujese la activación de la fracción de superlatentes de nuestra cepa y es posible que así haya sido, pero dado su escaso porcentaje en la población ( $<10\%$ ) no es sorprendente que no se pueda demostrar, al menos con nuestra metodología.

Una vez deducido que los esporos de nuestra suspensión contenían ácido dipicolínico suficiente para inducir el desarrollo de la fase II de la germinación y puesto que su presencia podría utilizarse como un indicador temprano de entrada en la fase I de germinación con otras tecnologías, decidimos poner a punto una técnica sencilla para cuantificar la liberación de DPA y estudiar su relación con la concentración de esporos que inician la germinación.

El protocolo para determinar el DPA liberado consistió en medir la absorbancia a 270 nm del medio de germinación una vez retirados los esporos mediante centrifugación. Según Setlow, Cowan y Setlow (2003) este componente es responsable de más del 90% de la absorción a esta longitud de onda.

En primer lugar, procedimos a elaborar la curva de calibración del ácido dipicolínico para establecer el rango de concentraciones en que su relación con la absorbancia era lineal. Posteriormente, procedimos a relacionar la concentración de DPA liberado con el número de esporos de la suspensión. Para liberar el total del DPA contenido por los esporos procedimos a aplicar una esterilización de alta intensidad

(121°C, 20 minutos) siguiendo las indicaciones de Setlow, Cowan y Setlow (2003) y Krawczyk et al. (2016). Los resultados obtenidos se incluyen en la figura 9.



**Figura 9.** Curva patrón de concentración de DPA (pg/mL) en agua destilada estéril (A) y relación entre la concentración de microorganismos y la absorbancia del medio tras esterilización (B).

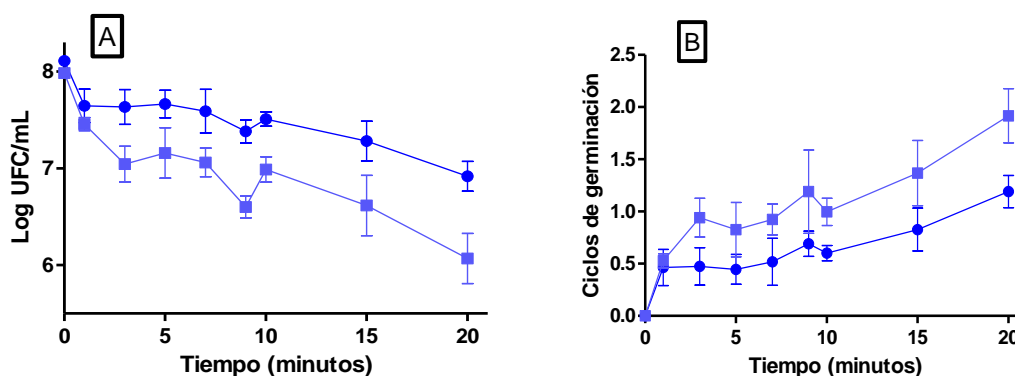
De la figura 9A se deduce que existe una relación lineal (Absorbancia =  $6 \times 10^{-8}$  DPA - 0,018;  $R^2 = 0,9993$ ) entre la concentración de DPA (pg/mL) y la absorbancia a 270 nm, a todas las concentraciones investigadas (hasta 175.000.000 pg/mL). La figura 9B muestra la relación existente entre la concentración de esporos y el DPA liberado tras la esterilización. Según Yi et al. (2011) la liberación de DPA es proporcional al número de esporos y nuestros datos confirman esta observación (Absorbancia =  $5 \times 10^{-8}$  UFC/mL + 0,0231;  $R^2 = 0,9982$ ).

Sustituyendo los valores de absorbancia de la figura 9B en la ecuación de la figura 9A puede obtenerse la concentración de DPA liberada para cada concentración de esporos: Concentración DPA =  $0,7539$  UFC/mL + 684.526;  $R^2 = 0,9982$ . A partir de esta ecuación pudimos concluir que la concentración liberada por cada espora de *B. weihenstephanensis* era de 0,85 picogramos ( $\pm 0,07$ ). No existen en la bibliografía datos sobre estos valores por lo que resultó imposible comparar nuestros resultados.

#### 4.2.2.3. Germinación inducida por altas presiones

Una vez conocido el efecto de la germinación como consecuencia de la presencia de componentes nutritivos y del ácido dipicolínico decidimos caracterizar el efecto de la germinación física por altas presiones. Según se ha indicado en la introducción se cree que las altas presiones permeabilizan la membrana interna del protoplasto de los esporos forzando la salida de ácido dipicolínico y calcio, es decir, la fase I de la germinación, sin necesidad de que se activen los canales de transporte del DPA mediados por los receptores

de nutrientes. Los tratamientos se aplicaron a 400 MPa, la presión más alta alcanzable por limitaciones de nuestro equipo.



**Figura 10.** Efecto de las altas presiones (400 MPa) en la germinación de *B. weihenstephanensis*. (A) Curvas de supervivencia antes (●) y después (■) de una pasteurización a 75°C durante 10 minutos. (B) Curvas de germinación.

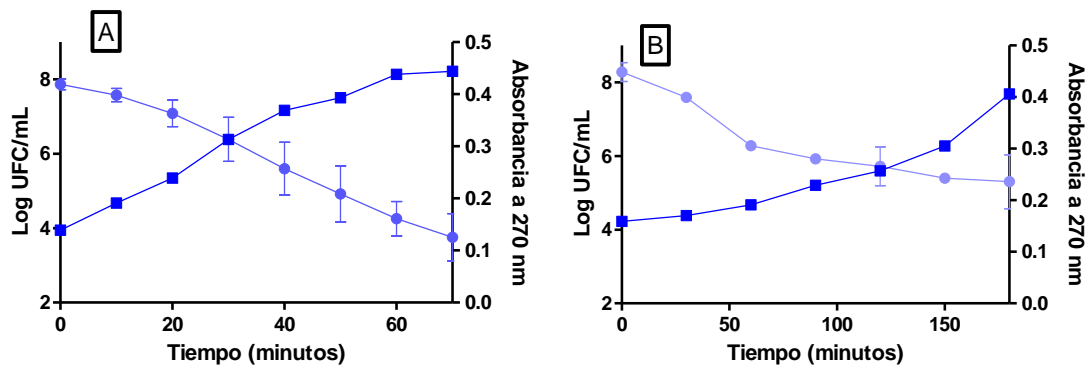
Como muestra la figura 10A en menos de un minuto de tratamiento se produce la rápida inactivación del 60% aproximadamente de la población original, seguido de un hombro de 6 minutos aproximadamente, durante el cual el recuento se mantiene constante, a partir del minuto 10 el número de supervivientes es una función exponencial del tiempo. Cabe destacar que la caída inicial no se debe a la coexistencia de esporos y células vegetativas dado que en el tiempo 0 de tratamientos los recuentos antes y después de la pasteurización no difieren significativamente. Este hecho implica que más de la mitad de la población original es muy sensible a las altas presiones o que inician la germinación en menos de 1 minuto y son inmediatamente inactivadas por la presión. El hombro podría corresponder al resto de la población que comenzaría a germinar a partir de los 10 minutos y que se inactivaría siguiendo un orden exponencial. La curva de supervivencia obtenida tras la pasteurización de las muestras tratadas por alta presión sigue un curso similar, aunque la caída inicial se prolonga hasta los tres minutos y afecta al 90% aproximadamente de la población inicial. A los 20 minutos de presurización un 99,4% de esporos son sensibles a la pasteurización. Según Wuytack, Boven y Michiels (1998) la inactivación de esporos por altas presiones es debida a la inducción de la germinación y posterior inactivación. Los datos de inactivación de nuestro estudio son similares a los obtenidos por Raso, Barbosa-Cánovas y Swanson (1998) con *B. cereus*, que tras ser tratado 15 minutos a 400 MPa presentaba una inactivación de un ciclo logarítmico.

Tanto nuestros datos como los del resto de investigadores sugieren que los esporos son poco sensibles a la presión y que deben germinar como paso previo a su inactivación. Si esto es así, nuestras gráficas de supervivencia demuestran que existen distintas fracciones en la población inicial que germinan como consecuencia de la presurización a distintos ritmos. La figura 10B permite apreciar los ritmos de germinación de estas subpoblaciones. Al margen de la existencia de subpoblaciones con distintos ritmos de germinación de la figura se deduce que en la población coexisten células en distintas fases de germinación puesto que se inactivan de diferente forma al aplicar las dos tecnologías: calor y altas presiones. En la figura 10B se aprecia que, por ejemplo, tras 20 minutos de presurización un 90% de la población se inactiva por la propia presión, pero si después se aplica calor se inactiva un ciclo logarítmico adicional; dicho en otras palabras: deben coexistir esporos en una fase tal que los sensibiliza al calor, pero no a la presión, y otros en una fase tal que los sensibiliza frente a ambas tecnologías. No existen datos en la bibliografía en los que se describa este hecho, pero en base al conocimiento actual ambas fracciones podrían corresponderse con esporos en las fases I y II de la germinación. De ser así queda por demostrar en qué fase son sensibles a una o a ambas tecnologías.

#### 4.2.2.4. Germinación inducida con HCl y NaOH

Aunque existen referencias antiguas (Keynan et al., 1964; Issahary, Evenchik y Keynan, 1970) de que la acidificación del medio puede estimular la germinación de los esporos, este es un aspecto muy poco conocido y que nunca se ha evaluado desde un punto de vista cinético. Por otra parte, se sabe que el hidróxido sódico altera el “coat” de los esporos, pero existen muy pocos datos sobre si esta rotura induce o no la germinación de los esporos. Por este motivo decidimos explorar los efectos de ambos factores en la germinación de la cepa objeto de estudio. Para la consecución de dicho objetivo expusimos la suspensión a soluciones de HCl 1N y NaOH 1N durante diferentes tiempos y determinamos el porcentaje de esporos capaces de germinar. Paralelamente estudiamos la liberación del DPA con el fin de establecer si este compuesto está implicado en el mecanismo de germinación; en otras palabras, si estos compuestos forzaban el paso a la fase I de la germinación.

La figura 11A muestra la evolución de la germinación y de la liberación de DPA en presencia de ácido clorhídrico, y la figura 11B en presencia de hidróxido sódico.



**Figura 11.** Efecto del HCl 1N (A) y del NaOH 1N (B) en la germinación de los esporos de *B. weihenstephanensis*: esporos latentes (●) y de DPA liberado (■).

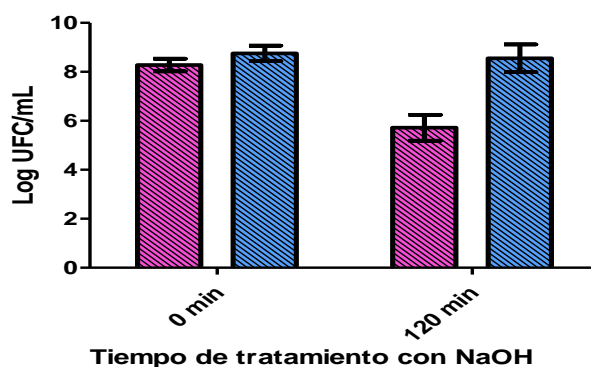
En la gráfica anterior se observa como al principio la salida de DPA es prácticamente lineal y posteriormente la velocidad de salida disminuye, lo que parece lógico dado que el número de esporos disminuye a un ritmo prácticamente exponencial. A los 60 minutos de tratamiento el 99,9% de la población inicial es incapaz de formar colonias en agar nutritivo mientras que ha salido aproximadamente un 80% del DPA total, según nuestros cálculos. Esta salida de DPA es similar a la observada por Setlow et al. (2002) en *B. subtilis*, (85%).

Por otra parte, y lo que es más importante, nuestros resultados demuestran que el ácido clorhídrico induce la salida del DPA intraprotoplasmático, es decir, el inicio de la fase I de la germinación. Por otra parte, también demuestran que no es necesario que salga todo el DPA del espora para inhibir su crecimiento posterior puesto que la concentración de DPA aumenta linealmente con el tiempo y la fracción capaz de formar colonias disminuye exponencialmente. Además de la salida de DPA, que indicaba la entrada en fase I de germinación, la observación microscópica demostró que los esporos mantenían su refringencia, es decir que no habían alcanzado la fase II de germinación. En otras palabras, interpretando los resultados según la opinión actual de la mayoría de los autores, el ácido clorhídrico induce la salida de DPA y, por tanto, inicia la fase I de la germinación, pero inhibe el paso a la fase II. Esta es una observación importante que merecería un estudio posterior. Es posible que el medio ácido desnaturalice los enzimas líticos del córtex, o que la rápida lixiviación del DPA impida la activación de estos enzimas en el medio nutritivo.

La velocidad de salida del DPA durante el tratamiento con NaOH (figura 11B) resultó más lenta que la observada en el tratamiento con el HCl. A las 2 horas de

tratamiento se había liberado menos del 50% del DPA total, pero a las 3 horas se alcanzaba un 90,57%, valor próximo al máximo alcanzado con HCl. Setlow et al. (2002) observaron que tras 2 horas de tratamiento con NaOH 1N, *B. subtilis* liberaba no más de un 10% de DPA, lo que indica que nuestra cepa es más sensible a la alcalinización. En cualquier caso, la mayoría de las conclusiones extraídas de los datos obtenidos con el ácido son comunes a las deducidas de estos experimentos. En principio la salida de DPA indicaría que se alcanza la fase I de la germinación y la bajada de los recuentos que el proceso se paraliza en alguna de las fases posteriores. Dado el interés del tema decidimos profundizar un poco más en el estudio de este fenómeno.

Otros autores (Duncan, Labbe y Reich, 1972; Setlow et al., 2002), habían observado previamente que el tratamiento con NaOH conlleva una reducción del recuento al sembrar en ANYE. En cualquier caso, como ya hemos indicado en el caso del medio ácido, cabrían dos posibilidades: o la pérdida de DPA es tal que los enzimas líticos del córtex no pueden activarse, o se produce una desnaturalización o pérdida de tales enzimas durante el tratamiento con el álcali. En cualquiera de los dos casos, puesto que la sosa altera el “coat”, el tratamiento con lisozima, que puede sustituir a los enzimas incluso en ausencia de DPA, revertiría el efecto. Para comprobar ese extremo se realizó un tratamiento con lisozima posterior al tratamiento con NaOH (figura 12).

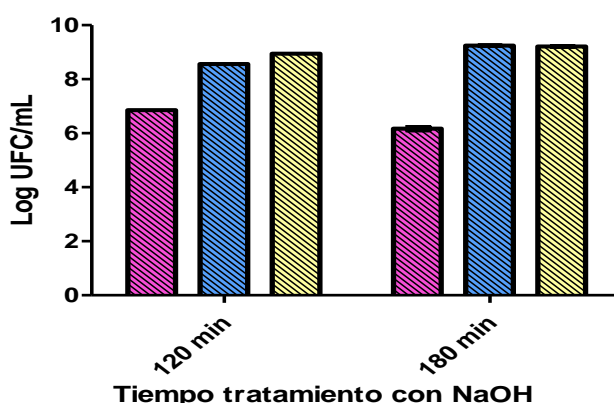


**Figura 12.** Recuento en ANYE, antes (■) y después de un tratamiento con lisozima (■), de esporos sometidos a una solución de NaOH 1N durante 0 y 120 minutos.

Como se puede apreciar en la figura 12 el tratamiento con lisozima de los esporos no tratados con NaOH no tuvo, como era de esperar, ningún efecto en los recuentos. Esto puede ser debido tanto a que los esporos mantienen todos los enzimas capaces de lisar el córtex, como a que la lisozima es incapaz de atravesar las envolturas externas (“coat”) cuando están integra. Por el contrario, tras 120 minutos de tratamiento con NaOH 1N, el

recuento en ANYE disminuye con respecto al tiempo cero; sin embargo, cuando los esporos se tratan con lisozima recuperan su capacidad de crecer en placa. Estos resultados demuestran que la inhibición de la capacidad de germinación de los esporos tratados con NaOH se debe a su incapacidad para superar la fase II de la germinación.

De manera adicional, se comprobó si los esporos tratados con NaOH recuperaban la capacidad de crecer en placa al tratarse con Ca-DPA lo que permitiría discernir si la inhibición se debía a la carencia de DPA o a la desnaturalización/pérdida de los enzimas líticos del córtex. Los resultados obtenidos se resumen en la figura 13.



**Figura 13.** Recuento en ANYE antes ( ) y después de un tratamiento con lisozima ( ) o con Ca-DPA ( ) de esporos sometidos a una solución de NaOH 1N durante 120 y 180 minutos a 25°C.

De los resultados incluidos en la figura 13 puede concluirse que el tratamiento con Ca-DPA posterior al tratamiento con NaOH restablece el recuento inicial hasta los mismos niveles a los que lo hace la lisozima; es decir, los esporos tratados con sosa son incapaces de superar la fase II de la germinación por la pérdida de ácido dipicolínico, pero mantiene íntegra su dotación de los enzimas líticos del córtex. Este resultado contradice la opinión de Setlow et al. (2002) según la cual el NaOH inhibe el crecimiento de *B. subtilis* alterando o liberando los enzimas CwlJ.

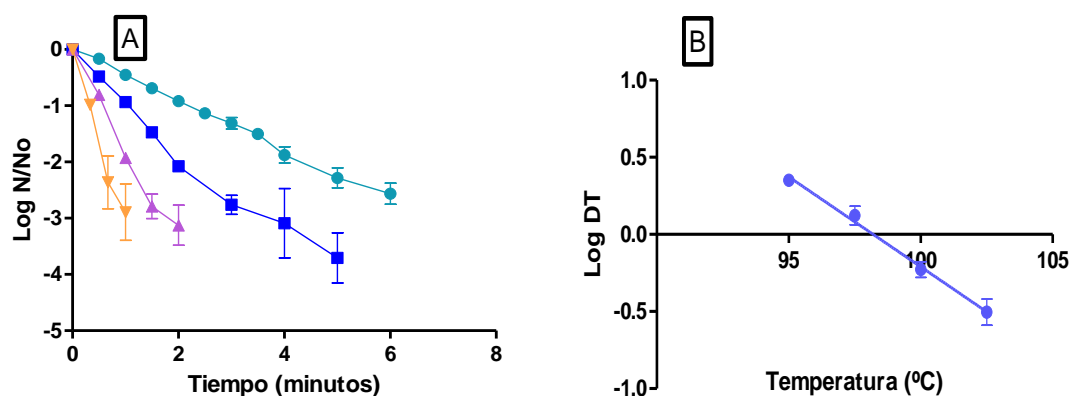
#### 4.3 Termorresistencia de *B. weihenstephanensis*

La última parte de nuestro trabajo pretendía caracterizar la termorresistencia de *B. weihenstephanensis* en las dos etapas de su ciclo vital y explorar la que presentan en distintas fases de germinación.



### 4.3.1 Termorresistencia de los esporos de *B. weihenstephanensis*

La termorresistencia de los esporos de *B. weihenstephanensis* se calculó elaborando las curvas de supervivencia a cuatro temperaturas: 95°C, 97,5°C, 100°C y 102,5°C. La figura 14 muestra los resultados obtenidos.



**Figura 14.** Curvas de supervivencia (A) y termodestrucción (B) de los esporos de *B. weihenstephanensis*. Los tratamientos se aplicaron en tampón McIlvaine de pH 7 a 95°C (●), 97,5°C (■), 100°C (▲) y 102,5°C (▼).

Como se observa en la figura 14A la inactivación de los esporos de nuestra cepa siguió un orden prácticamente exponencial, al menos en los dos primeros ciclos de inactivación. La ausencia de hombros indica que la fracción de esporos superlatentes, de existir, es poco importante. Esta observación respalda los resultados presentados en los apartados anteriores. Nuestra cepa presentó un valor  $D_{100} = 0,59$ . Este valor se encuentra en la media de los publicados por otros autores (González et al., 1999; Sarrías, Valero y Salmerón, 2002).

Como es bien sabido existe una relación exponencial entre los tiempos de reducción decimal y las temperaturas de tratamiento. Representando los logaritmos de los valores  $D_T$  frente a la temperatura de tratamiento se obtiene la línea de termodestrucción (figura 14B) cuya ecuación resultó ser:  $\text{Log } D_T = -0,1172T^a + 11,503$  ( $R^2 = 0,9943$ ).

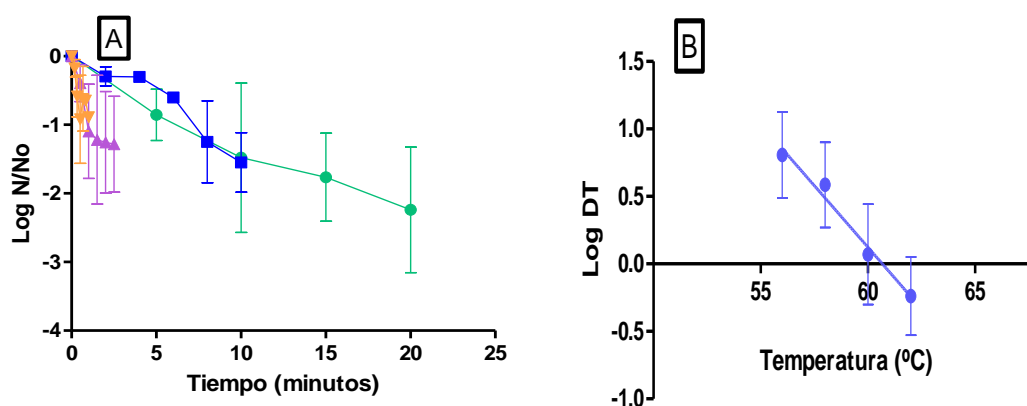
A partir de la inversa de la pendiente de la línea de termodestrucción obtuvimos un valor  $z$ , que se define como el número de grados que es preciso aumentar la temperatura para reducir los valores  $D_T$  a la décima parte, de 8,53°C. Dentro del amplio grupo de esporos relacionados con *B. cereus* el valor  $z$  varía desde 8°C hasta 12°C para aquellos más resistentes, encontrándose *B. weihenstephanensis* dentro de este grupo (Guérin et al., 2017). Nuestros resultados también confirman la opinión de otros autores

según los cuales los valores  $z$  de *B. weihenstephanensis* son inferiores a los de *B. subtilis*, cuyo valor  $z$  medio es de 11°C (Jagannath, Nakamura y Tsuchido, 2005).

#### 4.3.2. Termorresistencia de las células vegetativas de *B. weihenstephanensis*

En esta parte de la investigación procedimos a caracterizar la termorresistencia de las células vegetativas de nuestra cepa.

Este estudio, en principio simple y semejante al anterior resultó especialmente difícil. Si prolongábamos excesivamente el tiempo de incubación hasta bien entrada la fase estacionaria, como es habitual en el estudio de la termorresistencia de las células vegetativas de especies no formadoras de esporos, encontrábamos el problema de que coexistían células vegetativas y esporos. Si por el contrario reducíamos excesivamente el tiempo de incubación el recuento inicial era bajo dada nuestra metodología. Por ello fue necesario llegar a una solución de compromiso y determinar la termorresistencia de células obtenidas tras 24 horas de incubación, momento en que se alcanzaba la fase estacionaria de crecimiento y en la que pueden coexistir células en fase logarítmica y estacionaria de crecimiento. De hecho, en los experimentos realizados a distintas temperaturas observamos que una fracción de la población se inactivaba casi instantáneamente. Entendimos que esta fracción correspondería a las células en fase logarítmica por lo que procedimos a evaluar la termorresistencia solo de las que habrían alcanzado la fase estacionaria de crecimiento. La figura 15 muestra las líneas de supervivencia (A) y de termodestrucción (B) obtenidas.



**Figura 15.** Curvas de supervivencia (A) y termodestrucción (B) de las células vegetativas de *B. weihenstephanensis*. Los tratamientos se aplicaron en tampón McIlvaine de pH 7 a: 56°C (●), 58°C (■), 60°C (▲) y 62°C (▼).

Como se observa en la figura 15A la inactivación de las células siguió un curso exponencial al principio del tratamiento hasta alcanzar un nivel de recuento bajo en el que aparecían colas. Estas colas previsiblemente eran ocasionadas por la presencia de esporos que, como es bien sabido se forman al aproximarse a la fase estacionaria de crecimiento. Despreciando las colas calculamos los valores  $D_T$  para cada temperatura. Representado los logaritmos de los valores  $D_T$  frente a las temperaturas de tratamiento obtuvimos la línea de termodestrucción (figura 15B) que seguía la ecuación:

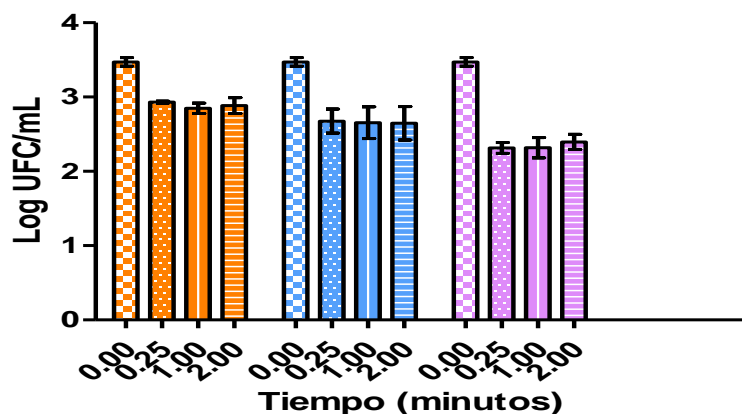
$$\text{Log } D_T = -0,1812T^a + 10,923 \quad (R^2 = 0,9734).$$

A partir de la ecuación de la línea de termodestrucción calculamos un valor  $D_{60} = 0,95$  y un valor  $z = 5,52^\circ\text{C}$ . El valor  $z$  obtenido es sensiblemente inferior al de los esporos de esta misma cepa, lo cual confirma un hecho asumido por la mayoría de los autores. El valor  $z$  de nuestra cepa es, comparado con el de las células vegetativas psicrotrofas de *B. cereus* ( $3,02-4,84^\circ\text{C}$ ) (Guérin et al., 2017), relativamente alto, aunque los datos publicados sobre este tipo de especies son demasiado escasos para sacar conclusiones generales. Nuestro valor  $z$  es similar al valor medio de otros microorganismos patógenos psicrotrofos como *Listeria monocytogenes* ( $5,1^\circ\text{C}$ ) (Aryani et al., 2011).

#### 4.3.3. Exploración de la termorresistencia en fases intermedias de germinación

Si en el apartado anterior describíamos las dificultades con las que nos habíamos encontrado para obtener las gráficas de supervivencia, en este apartado fueron tantas que no merece la pena describirlas con detalle. Baste decir que probamos a iniciar la germinación en caldo nutritivo, pretratando diferentes tiempos con clorhídrico y con hidróxido sódico y en ningún caso fue posible conseguir que al menos el 90% de la población estuviese en la misma fase de germinación. Por ello, decidimos tratar los esporos con HCl, ya que, como hemos descrito en el apartado correspondiente, los esporos quedaban bloqueados durante un tiempo en la fase I de la germinación.

Las condiciones seleccionadas para el estudio fueron HCl 1N durante 10 min a  $30^\circ\text{C}$  y tras dicho tratamiento los esporos se trataron con calor a tres temperaturas durante diferentes tiempos. La figura 16 resume los resultados obtenidos.



**Figura 16.** Inactivación de suspensiones de esporos de *B. weihenstephanesis* pretratadas 10 minutos en HCl 1N a 30°C y tratados térmicamente en tampón McIlvaine de pH 7 a 70°C (■), 75°C (■) y 80°C (■) durante 0 (■), 15 segundos (■), 1 minuto (■) y 2 minutos (■).

Lo más sorprendente de los resultados es que a todas las temperaturas investigadas se producía una inactivación casi instantánea (15 segundos) de una fracción más o menos numerosa de la población y que los recuentos no cambiaban al prolongar los tiempos de calentamiento hasta dos minutos y medio. Por otra parte, los ciclos de inactivación alcanzados a los 15 segundos de tratamiento eran diferentes a las distintas temperaturas. No existe ninguna investigación al respecto que nos permita comparar nuestros datos ni nos ayude a interpretar nuestros resultados. Dado que los valores  $z$  podrían oscilar entre 5 y 8°C, a juzgar por los resultados obtenidos en los apartados anteriores, y que 70°C es una temperatura letal en tan solo 15 segundos, los recuentos obtenidos a 70°C a lo largo de 2.5 minutos deberían haberse reducido, según nuestras previsiones al menos 10 veces. Lo mismo es extensivo al resto de temperaturas. Este hecho indicaría que la suspensión pretratada en clorhídrico comprende al menos cuatro subpoblaciones de diferentes termorresistencias y previsiblemente en distintas fases de germinación: una población de esporos latentes no afectados por el tratamiento con el ácido, que sobrevivirían al tratamiento a 80°C; una subpoblación en fase I incipiente, que sobreviviría a un tratamiento a 75°C pero no a 80°C; una subpoblación de fase I más tardía, que sobreviviría al tratamiento a 70°C pero no a 75°C; y finalmente la fracción más numerosa, que se encontraría en la fase I final o a comienzos de la fase II, que se inactivaría rápidamente a 70°C. No nos atrevemos a afirmar que se haya alcanzado la fase II de germinación porque en los estudios sobre los efectos del clorhídrico, como comentamos en el apartado correspondiente, nunca observamos al microscopio esporos que hubiesen perdido la refringencia, que es la característica diferencial de esta fase. No obstante, no es

descartable que durante el calentamiento se produjese un paso, que debería ser casi instantáneo, de la fase I a la fase II de la germinación. Este es un aspecto muy interesante que sin duda merecería un estudio posterior.

## 5. CONCLUSIONES

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

La cepa seleccionada para realizar nuestro estudio, *B. weihenstephanensis*, produce suspensiones de esporos con un escaso contenido de esporos superlatentes (<10%). Los esporos latentes son relativamente renuentes a la germinación con los germinantes nutritivos más estudiados -L-alanina, inosina y sus mezclas- pero son muy sensibles a los componentes del caldo nutritivo y AGFK, lo que implica que los receptores de la germinación de esta especie responden mejor a los azúcares y sales que a los aminoácidos.

Los tratamientos de alta presión inducen el inicio de la germinación de los esporos de *B. weihenstephanensis*. Transcurridos los primeros instantes de tratamiento, en cualquier momento, coexisten, además de los esporos latentes, dos subpoblaciones en dos estadios de germinación, en uno de los cuales son sensibles al calor y en otro en el que son sensibles al calor y a la presión.

La exposición de los esporos latentes a soluciones ácidas y alcalinas inducen la fase I de la germinación, pero inhiben la germinación en pasos posteriores. En el caso del hidróxido sódico, y previsiblemente también en el del clorhídrico, este hecho no se debe a la desnaturalización de los enzimas líticos del córtex sino a la lixiviación del ácido dipicolínico.

Las suspensiones en que se induce la germinación mediante su exposición a medios ácidos coexisten al menos tres fracciones de esporos con distinta resistencia al calor, que previsiblemente se encuentran en fase de latencia, fase I temprana de germinación y fase I tardía-fase II temprana de germinación.

## 6. CONCLUSIONS

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

The strain selected for our study, *B. weihenstephanensis*, produces spore suspensions with a low content of superlatent spores (<10%). Latent spores are relatively reluctant to germinate with the most studied nutritive germinants -L-alanine, inosine and their mixtures- but they are very sensitive to the components of the nutritive broth and AGFK, which implies that the germination receptors of this species respond better to sugars and salts than to amino acids.

High pressure treatments induce the beginning of germination of *B. weihenstephanensis* spores. After the first moments of treatment, at any time, in addition to the latent spores, two subpopulations of different stages of germination coexist, one is just sensitive to heat and the other one is sensitive both to heat and pressure.

Exposure of latent spores to acid and alkaline solutions induces stage I germination, but inhibits germination in subsequent steps. In the case of sodium hydroxide, and foreseeably also in the case of hydrochloric acid, this fact is not due to the denaturation of the cortex-lytic enzymes but to the leaching of dipicolinic acid.

The suspensions in which germination is induced by exposure to acid media coexist at least three spore fractions with different heat resistance, which are foreseeably in latency stage, early germination stage I and late germination stage I-early germination stage II.

## **7. VALORACIÓN PERSONAL**

Durante el transcurso de esta asignatura he aprendido a buscar información tanto en inglés como en español, a interpretarla y a gestionar la información recogida realizando un análisis y una selección de la misma. Además, me ha permitido entender el funcionamiento del laboratorio y me ha enseñado a planificar experimentos.

El tratamiento de los datos experimentales ha contribuido a mi formación gracias al aprendizaje sobre el manejo de equipos y programas informáticos. De manera adicional, he ampliado los conocimientos adquiridos durante el Grado, sobre todo, aquellos relacionados con la germinación de esporos bacterianos.

La mayor dificultad de esta asignatura para mí ha sido ser capaz de interpretar los datos relevantes para emitir juicios que incluyan una reflexión científica. Aunque, gracias a la ayuda de Virginia Ruiz y del Dr. Santiago Condón, he sido capaz de aprender a pensar y a razonar de manera crítica, así como a interpretar los datos experimentales obtenidos.



## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Alzaharani, O.M. y Moir, A. (2014). "Spore germination and germinant receptor genes in wild strains of *Bacillus subtilis*". *J. Appl. Microbiol.*, 117(3), pp. 741-749. DOI: 10.1111/jam.12566
- Aryani, D.C., den Besten, H.M.W., Hazeleger, W.C. y Zwietering, M.H. (2015). "Quantifying variability on thermal resistance of *Listeria monocytogenes*". *Int. J. of Food Microbiol.*, 193, pp. 130-138. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.021
- 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". *J. Microbiol.Methods*, 18, pp. 357-366.
- Condón, S., Palop, A., Raso, J. y Sala, F.J. (1996). "Influence of the incubation temperature after heat treatment upon the estimated heat resistance values of spores of *Bacillus subtilis*". *Lett. Appl. Microbiol.*, 22(2), pp. 149-152 DOI: 10.1111/j.1472-765X.1996.tb01130.x
- Duncan, C.L., Labbe, R.G. y Reich, R.R. (1972). "Germination of heat- and alkali-altered spores of *Clostridium perfringens* type A by lysozyme and an initiation protein". *J. Bacteriol.*, 109(2), pp. 550-559. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC285176/> [Consultado: 02-05-2019]
- Gayán, E. (2013). *Development of combined treatments for food hygienization based on UV light and mild heat*. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Ghosh, S. y Setlow, P. (2009). "Isolation and characterization of superdormant spores of *Bacillus* species". *J. Bacteriol.*, 191(6), pp. 1787-1797. DOI: 10.1128/JB.01668-08
- González, I., López, M., Martínez, S., Bernardo, A. y González, J. (1999). "Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores formed at different temperatures". *Int. J. of Food Microbiol.*, 51(1), pp. 81-84. DOI: 10.1016/S0168-1605(99)00109-9
- Gounina-Allouane, R., Broussolle, V. y Carlin, F. (2008). "Influence of the sporulation temperature on the impact of the nutrients inosine and L-alanine on *Bacillus cereus* spore germination". *Food Microbiol.*, 25(1), pp. 202-206 DOI: 10.1016/j.fm.2007.08.002
- Guérin, A., Dargaignaratz, C., Clavel, T., Broussolle, V. y Nguyen-the, C. (2017). "Heat-resistance of psychrotolerant *Bacillus cereus* vegetative cells". *Food Microbiol.*, 64, pp. 195-201. DOI: 10.1016/j.fm.2017.01.009
- Hitchins, A.D. (1968). "Factors influencing the extent of germination of *Bacillus coagulans* spore populations". *J. Gen. Microbiol.*, 54(2), pp. 247-254. Disponible en: <https://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-54-2-247> [Consultado: 14-05-2019]
- Ireland, J.A. y Hanna, P.C. (2002). "Amino acid- and purine ribonucleoside-induced germination of *Bacillus anthracis* DeltaSterne endospores: gerS mediates responses to aromatic ring structures". *J. Bacteriol.*, 184(5), pp. 1296-1303. DOI: 10.1128/JB.184.5.1296-1303.2002
- Issahary, G., Evenchik, Z. y Keynan, A. (1970). "Low-pH activation of *Bacillus cereus* spores". *J. Bacteriol.*, 101(2), pp. 418-422. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC284922/> [Consultado: 01-05-2019]
- Jagannath, A., Nakamura, I. y Tsuchido, T. (2005). "Modelling the combined effects of pH, temperature and sodium chloride stresses on the thermal inactivation of *Bacillus subtilis* spores in a buffer system". *J. Appl. Microbiol.*, 95(1), pp. 135-141. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.01952.x
- Keynan, A., Evenchik, Z., Halvorson, H.O. y Hastings, J.W. (1964). "Activation of bacterial endospores". *J. Bacteriol.*, 88(2), pp. 313-318. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC277301/> [Consultado: 01-05-2019]
- Klobutcher, L.A., Ragkousi, K. y Setlow, P. (2006). "The *Bacillus subtilis* spore coat provides "eat resistance" during phagocytic predation by the protozoan *Tetrahymena thermophila*". *PNAS*, 103(1), pp. 165-170. DOI: 10.1073/pnas.0507121102
- Kohler, L.J., Quirk, A.V., Welkos, S.L. y Cote, C.K. (2017). "Incorporating germination-induction into decontamination strategies for bacterial spores". *J. Appl. Microbiol.*, 124(1), pp. 2-14. DOI: 10.1111/jam.13600
- Krawczyk, A.O., Berendsen, E.M., de Jong, A., Boekhorst, J., Wells-Bennik, M.H., Kuipers, O.P. y Eijlander, R.T. (2016). "A transposon present in specific strains of *Bacillus subtilis* negatively affects nutrient- and dodecylamine-induced spore germination". *Environ. Microbiol.*, 18(12), pp. 4830-4846. DOI: 10.1111/1462-2920.13386
- Magge, A., Granger, A.C., Wahome, P.G., Setlow, B., Vepachedu, V.R., Loshon, C.A., Peng, L., Chen, D., Li, Y. y Setlow, P. (2008). "Role of dipicolinic acid in the germination, stability, and viability of spores of *Bacillus subtilis*". *J. Bacteriol.*, 190(14), pp. 4798-4807. DOI: 10.1128/JB.00477-08

- McKenney, P.T., Driks, A. y Eichenberger, P. (2013). "The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat". *Nat. Rev. Microbiol.*, 11(1), pp. 33-44 DOI: 10.1038/nrmicro2921
- Moir, A. (1990). "The genetics of bacterial spore germination". *Annu. Rev. Microbiol.*, 44(1), pp. 531-553. DOI: 10.1146/annurev.mi.44.100190.002531
- Moir, A. y Cooper, G. (2015). "Spore germination". *Microbiol. Spectr.*, 3(6). DOI: 10.1128/microbiolspec.TBS-0014-2012
- Paidhungat, M., Ragkousi, K. y Setlow, P. (2001). "Genetic requirements for induction of germination of spores of *Bacillus subtilis* by Ca(2+)-dipicolinate". *J. Bacteriol.*, 183(16), pp. 4886-4893 DOI: 10.1128/JB.183.16.4886-4893.2001
- Piggot, P.J. y Hilbert, D.W. (2004). "Sporulation of *Bacillus subtilis*". *Curr. Opin. Microbiology*, 7(6), pp. 579-586. DOI:10.1016/j.mib.2004.10.001
- Ramos, S.J., Chiquirrín, M., García, S., Condón, S. y Pérez, M.D. (2015). "Effect of high pressure treatment on inactivation of vegetative pathogens and on denaturation of whey proteins in different media". *LWT - Food Sci. Technol.*, 63(1), pp. 732-738 DOI: 10.1016/j.lwt.2015.03.085
- Raso, J., Barbosa-Cánovas, G. y Swanson, B.G. (1998). "Sporulation temperature affects initiation of germination and inactivation by high hydrostatic pressure of *Bacillus cereus*". *J. Appl. Microbiol.*, 85(1), pp. 17-24. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1998.00460.x
- Ryu, J.H., Kim, H. y Beuchat, L.R. (2005). "Spore formation by *Bacillus cereus* in broth as affected by temperature, nutrient availability, and manganese". *J. Food Prot.*, 68(8), pp. 1734-1738. DOI: 10.4315/0362-028X-68.8.1734
- Sarrías, J.A., Valero, M. y Salmerón, M.C. (2002). "Enumeration, isolation and characterization of *Bacillus cereus* strains from Spanish raw rice". *Food Microbiol.*, 19(6), pp. 589-595. DOI: 10.1006/fmic.2002.0514
- Setlow, P. (2003). "Spore germination". *Curr. Opin. Microbiol.*, 6(6), pp. 550-556. DOI: 10.1016/j.mib.2003.10.001
- Setlow, P. (2006). "Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals". *J. Appl. Microbiol.*, 101(3), pp. 514-525. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x
- Setlow, P. (2014a). "Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know". *J. Bacteriol.*, 196(7), pp. 1297-1305. DOI: 10.1128/JB.01455-13
- Setlow, P. (2014b). "Spore resistance properties". *Microbiol. Spectr.*, 2(5), pp. 11-21. DOI: 10.1128/microbiolspec.TBS-0003-2012
- Setlow, B., Cowan, A.E. y Setlow, P. (2003). "Germination of spores of *Bacillus subtilis* with dodecylamine". *J. Appl. Microbiol.*, 95(3), pp. 637-648. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.02015.x
- Setlow, P. y Johnson, E.A. (2007). "Spores and their significance". En: Doyle, M. P. y Beuchat, L. R. (Eds.). *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. (3rded.) Washington D.C.: ASM Press, pp. 35-69.
- Setlow, B., Loshon, C.A., Genest, P.C., Cowan, A.E., Setlow, C. y Setlow, P. (2002). "Mechanisms of killing spores of *Bacillus subtilis* by acid, alkali and ethanol". *J. Appl. Microbiol.*, 92(2), pp. 362-375. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2002.01540.x
- Wax, R. y Freese, E. (1968). "Initiation of the germination of *Bacillus subtilis* spores by a combination of compounds in place of L-alanine". *J. Bacteriol.*, 95(2), pp. 433-438. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC252036/> [Consultado: 16-05-2019]
- Wuytack, E.Y., Boven, S. y Michiels, C.W. (1998). "Comparative study of pressure-induced germination of *Bacillus subtilis* spores at low and high pressures". *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(9), pp. 3220-3224. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC106713/> [Consultado: 10-05-2019]
- Yi, X., Liu, J., Faeder, J.R. y Setlow, P. (2011). "Synergism between different germinant receptors in the germination of *Bacillus subtilis* spores". *J. Bacteriol.*, 193(18), pp. 4664-4671. DOI: 10.1128/JB.06146-11
- Yi, X. y Setlow, P. (2010). "Studies of the commitment step in the germination of spores of *Bacillus* species". *J. Bacteriol.*, 192(13), pp. 3424-3433. DOI: 10.1128/JB.00326-10
- Zhang, Y. y Mathys, A. (2019). "Superdormant spores as a hurdle for gentle germination-inactivation based spore control strategies". *Front. Microbiol.*, 9(3163). DOI: 10.3389/fmicb.2018.03163