

Termorresistencia y cinética de germinación de esporos de *Bacillus subtilis* 168 obtenidos en medios con actividad de agua reducida

Introducción y Objetivo

Los esporos bacterianos provocan alteraciones de los alimentos y toxiinfecciones alimentarias debido a su gran resistencia a los procesos de conservación [1]. No todos los esporos, ni tan siquiera de la misma suspensión, germinan de manera sincronizada ni frente a los mismos estímulos, lo que dificulta el uso de estrategias basadas en eliminar los esporos germinados, más sensibles, aplicando tratamientos de menor intensidad [2]. Por el momento, existen pocos datos sobre el efecto de otras condiciones de esporulación, además de la temperatura, en la termorresistencia y su efecto en la cinética de germinación [3].

En este trabajo, se estudió el comportamiento de esporos de *Bacillus subtilis* 168 obtenidos en medios con actividad de agua reducida ($a_w = 0.98$) con dos solutos, cloruro sódico y glicerol, en comparación con los obtenidos en condiciones óptimas (controles).

Resultados y discusión

Resistencia al calor

Todas las suspensiones presentaron hombros en las termorresistencias a 105°C, siendo éste mucho mayor en los esporos obtenidos a baja a_w con ambos solutos (Fig. 1). Además, los esporos obtenidos a a_w reducida con glicerol resultaron ser los que presentaban un mayor valor Z (9,4°C frente a 7,6°C en los controles). El contenido en ácido dipicolínico (DPA) de los esporos obtenidos en glicerol (1,3 pg/esporo) y cloruro sódico (1,0 pg/esporo) fue mayor que en los controles (0,8 pg/esporo), lo que podría explicar, al menos en parte, la mayor resistencia al calor de las suspensiones obtenidas a baja a_w [4].

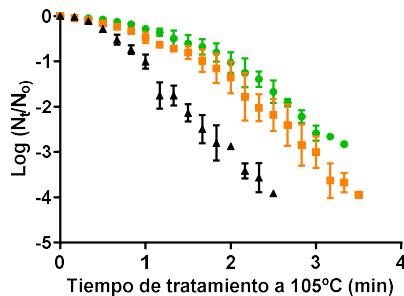


Figura 1. Gráfica de supervivencia a 105°C en tampón McIvaine de pH 7.0 de las suspensiones control (▲) y obtenidas a a_w reducida en presencia de glicerol (■) o cloruro sódico (●). Se muestra la tendencia promedio y la desviación estándar de tres réplicas biológicas

Germinación: Nutrientes

La cinética de germinación se estudió mediante la monitorización del descenso de la densidad óptica (DO, 600 nm) y/o la liberación de DPA por fluorimetría con TbCl. El porcentaje de esporos germinados al final de cada ensayo fue confirmado por recuento microscópico.

La germinación inducida por L-valina, L-alanina y AGFK (L-asparagina, D-glucosa, D-fructosa y potasio) resultó ser deficiente en todos los esporos obtenidos a baja a_w en comparación con los obtenidos en condiciones óptimas (Fig. 2). Por el contrario, en caldo nutritivo enriquecido con extracto de levadura (CNEL), los esporulados en presencia de cloruro sódico presentaron una mayor velocidad de germinación que los controles (Fig. 2).

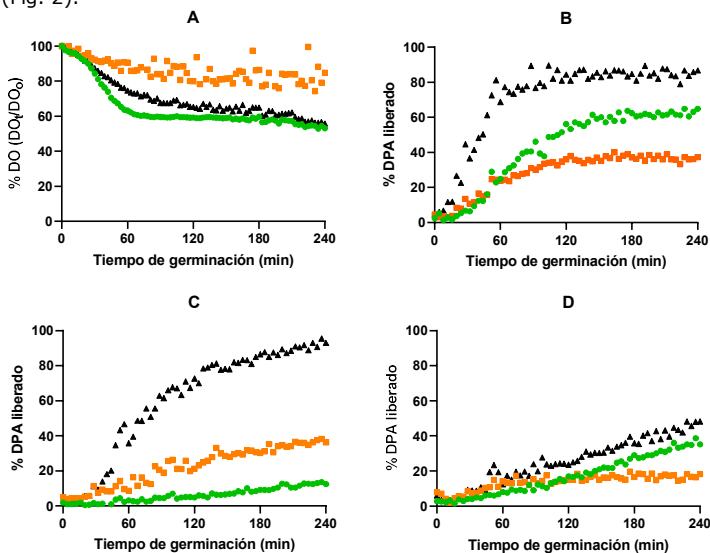


Figura 2. Cinéticas de germinación a 37°C de las suspensiones de esporos obtenidas en condiciones óptimas (▲) y a a_w reducida en presencia de glicerol (■) o cloruro sódico (●) frente a distintos nutrientes: A) Caldo nutritivo suplementado con extracto de levadura, B) L-alanina, C) L-valina y D) AGFK. Se muestra la tendencia promedio y desviación estándar de tres réplicas biológicas.

Germinación: Ca-DPA

La germinación inducida por dipicolinato cálcico (Ca-DPA) fue inferior en los esporos obtenidos a baja a_w (Fig. 3), lo que podría indicar diferencias estructurales en el córtex o deficiencias en los enzimas líticos del córtex [5].

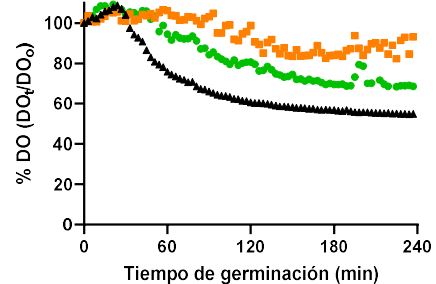


Figura 3. Cinéticas de germinación inducida con Ca-DPA a 30°C de las suspensiones de esporos obtenidas en condiciones óptimas (▲) y a a_w reducida en presencia de glicerol (■) o cloruro sódico (●). Se muestra la tendencia promedio y la desviación estándar de tres réplicas biológicas

Conclusiones

-Los esporos obtenidos a baja a_w con glicerol o cloruro sódico presentan una mayor termorresistencia a 105°C, y aquellos obtenidos con glicerol un mayor valor Z, que los esporos obtenidos en condiciones óptimas.

-Los esporos obtenidos a baja a_w muestran una menor velocidad de germinación con L-alanina, L-valina, AGFK y Ca-DPA que los obtenidos en condiciones óptimas. Únicamente las suspensiones esporuladas con cloruro sódico germinaban más rápido en CNEL que los controles.

-Estos resultados muestran la relevancia de la a_w durante la esporulación en la resistencia de los esporos y en la heterogeneidad de germinación, factores que condicionan el diseño de estrategias orientadas al control de esporos en la industria alimentaria.

Referencias

- [1] P. Setlow, J. T. Liu y J. R. Faeder, *Bacterial Spores: Current Research and Applications*, ed. E. Abel-Santos, **2012**, Norwich: Horizon Scientific Press.
- [2] Y. Zhang y A. Mathys, *Front. Microbiol.*, **2018**, *9*, pp. 3163
- [3] H. N. T. Minh, A. Durand, P. Loison, J. Perrier-Cornet y P. Gervais, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2011**, *90*, pp. 1409-1417.
- [4] M. Paidhungat, B. Setlow, A. Driks y P. Setlow, *J. Bacteriol.*, **2000**, *182*, pp. 5505-5512.
- [5] M. Paidhungat, K. Ragkousiy y P. Setlow, *J. Bacteriol.*, **2001**, *183*, pp. 4886-4893.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado con una beca predoctoral del Gobierno de Aragón concedida a Víctor Freire y un proyecto de investigación (PID2019-104712RA-I00) financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033.