

Métodos para la inactivación de esporas en alimentos

L. C. Huesca-Espitia^{1*}, J.L. Sánchez-Salas² y E. R. Bandala¹

¹Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Universidad de las Américas Puebla.

Ex hacienda Sta. Catarina Mártir S/N, San Andrés Cholula, Puebla. C.P.72810. México.

²Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad de las Américas Puebla.

Ex hacienda Sta. Catarina Mártir S/N, San Andrés Cholula, Puebla. C.P.72810. México.

RESUMEN

Los microorganismos, en especial los formadores de esporas, presentan un gran reto para la industria de los alimentos en su continua preocupación de producir alimentos inocuos. Para tratar de eliminar a los microorganismos se han desarrollado diferentes metodologías para su procesamiento; por ejemplo, los tratamientos térmicos, aquellos basados en factores químicos como la acidificación, o la combinación de ambos, las tecnologías emergentes como el plasma y los procesos avanzados de oxidación. Sin embargo, no todos ellos son eficientes en la eliminación de esporas debido a las características morfológicas de éstas, que les proporcionan resistencia ante condiciones adversas y además, a que la población es heterogénea en cuanto a tiempos de germinación, que pueden ser desde días hasta períodos de tiempo muy prolongados como es el caso de las esporas superlatentes. En este trabajo se analizan los aspectos más relevantes en la microbiología de alimentos y tratamientos asociados al procesado de éstos. Se enfocará en presentar los procesos o métodos aplicados hasta el momento sobre la inactivación de esporas de microorganismos que afectan el deterioro de los alimentos o que causan daño a la salud de los consumidores.

Palabras clave: microorganismos, esporas, superlatentes, tecnologías emergentes.

ABSTRACT

Microorganisms, especially spore-forming bacteria, are a big challenge for the food industry in its continuing concern to produce safe and high quality food. Different processing methodologies have been developed trying to eliminate these microorganisms, such as heat treatments, those based on chemical factors such as acidification, or the combination of them, as well as emerging technologies such as plasma and advanced oxidation processes. However, not all of them are efficient in removing spores due to the morphological characteristics which provide resistance to adverse conditions and also because of the population heterogeneity in terms of germination time, that can be from days to very long periods of time like in superdormant spores. In this work the most important in food microbiology and treatments associated with the processing of these aspects are analyzed. It will focus on presenting the processes or methods used so far on the inactivation of spores of microorganisms affect food spoilage or cause damage to the health of consumers.

Keywords: microorganisms, spores, superdormant, emerging technologies.

* Programa de Doctorado
en Ciencia de Alimentos
Tel.: +52 222 229 2126
Fax: +52 222 229 2727
Dirección electrónica:
luz.huescaea@udlap.mx

Introducción

En el mundo actual y con el acelerado ritmo de vida que caracteriza al siglo XXI, tanto la producción y el consumo de alimentos procesados tienen un impacto económico positivo para todos los países, como aquellos en desarrollo incluido el nuestro, que han aumentado su tasa de producción, ya sea para sustentar su consumo interno o para exportar. Sin embargo, un impacto negativo de grandes dimensiones puede ocurrir si se presentan brotes de enfermedades transmitidas por alimentos o un deterioro de los alimentos de exportación a gran escala. En el caso de la industria de jugos de frutas, se han reportado en los últimos 20 años brotes de patógenos como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp y *Cryptosporidium parvum* (CDC, 1996, 1999, 2006, 2007), así como microorganismos deteriorativos como *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Chang y Kang, 2004). Todo esto ha impuesto grandes retos no sólo a la industria alimentaria sino a los investigadores en ciencia de alimentos en el desarrollo de metodologías con una alta eficiencia en la eliminación o inactivación de los microorganismos causantes de enfermedades. Por otra parte, se han tratado de entender los mecanismos por los cuales los microorganismos son, en algunas ocasiones, resistentes a los procesos convencionales. La microbiología de los alimentos ha experimentado un desarrollo considerable en los últimos años debido, en gran parte, a la modelación predictiva (McMeekin et al., 2008) y a la evaluación de riesgos (Hoorntstra y Notermans, 2001). A pesar de esto, su aplicación en diversas áreas de la industria alimentaria para mejorar la seguridad y calidad microbiológica de los alimentos aún es limitada.

En este trabajo se analizan los aspectos más relevantes en la microbiología de alimentos y tratamientos asociados al procesado de éstos. Se enfocará en presentar los procesos o métodos aplicados hasta el momento sobre la inactivación de esporas de microorganismos que afectan el deterioro de los alimentos o que causan daño a la salud de los consumidores.

Revisión bibliográfica

1. Problemática de la contaminación microbiológica de los alimentos y agua

En la mayoría de los casos, los microorganismos utilizan a los alimentos como fuente de nutrientes, dando lugar al deterioro de éstos. Esto se debe no sólo a la presencia de microorganismos y a la utilización de sustancias nutritivas, sino también a

la producción de cambios enzimáticos que originan modificaciones del sabor debido a la degradación o síntesis de algunos compuestos. En el caso de los microorganismos patógenos podemos decir que la mayoría de los alimentos pueden servir para desarrollar o para actuar como vehículos de estos microorganismos, debido a esto, es necesario evitar su contacto y proliferación, así como lograr su eliminación durante el procesamiento (Floros et al., 2010).

1.1. Tipos de microorganismos contaminantes de alimentos y agua

La mayoría de los microorganismos que contaminan a los alimentos y al agua son bacterias mesofílicas (crecen entre 20 y 42°C) (tabla I), de las cuales un alto porcentaje son patógenas en estas condiciones de temperatura, también están presentes otros tipos de microorganismos como levaduras, mohos y virus. Los alimentos se descomponen por acción microbiana a temperatura ambiente, por lo que es necesario procesarlos y mantenerlos a temperaturas extremas, ya sea calientes o fríos, para evitar la proliferación de los microorganismos. Aproximadamente a -10°C cesa por completo la tasa metabólica de los microorganismos y entran en un estado de latencia y cuando las condiciones son nuevamente propicias, los microorganismos activan sus procesos metabólicos y comienzan de nuevo a reproducirse. Por otra parte, muy pocas bacterias sobreviven a temperaturas superiores a los 90°C, las que lo hacen se les denomina termofílicas (45-100°C). Entre las bacterias que sobreviven a altas temperaturas se encuentran aquellas cuyo ciclo de vida incluye la producción de esporas, por ejemplo los géneros *Clostridium* y *Bacillus*. Las esporas son estructuras que resisten temperaturas de más de 100°C durante largos períodos de tiempo (de hasta 20 minutos), sin ser destruidas. Algunas especies producen toxinas que pueden o no resistir el tratamiento térmico. La bacteria *Clostridium botulinum* además genera toxinas muy poderosas que vuelven tóxicos a los alimentos generando la enfermedad llamada botulismo (Frazier y Westhoff, 1991; Adams y Moss, 1997; Jay, 2000).

1.2. Bacterias que forman esporas

Las bacterias tienen muchas estrategias para sobrevivir al ambiente. Estas estrategias implican con frecuencia los cambios rápidos en la expresión de genes que alteran temporalmente el fenotipo de una célula y le permiten sobrevivir. Un ejemplo sofisticado de la respuesta al estrés es la formación de esporas, o esporulación, en el que el genoma bacteriano es conservado en un lugar seguro (la espora) hasta que mejoran las condiciones ambientales, y es entonces cuando la espora germina y vuelve

Tabla I. Bacterias deteriorativas en alimentos y de aplicación en la industria alimentaria.

Tipo de Microorganismos			Características	Importancia en la microbiología de los alimentos
Familia	Género	Especie		
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>		Bacilos no Esporulados Gram - negativos Uso de diversas fuentes de carbono principalmente aerobia protolíticas lipolíticas	Crecen sobre la superficie de los alimentos produciendo mucilagos y diversos pigmentos
	<i>Gluconobacter</i>	<i>G. oxydans</i>	Oxidan etanol, producen viscosidad en la cerveza	
<i>Halobacteriaceae</i>	<i>Halobacterium</i>	<i>H. salinarium</i>	Halófilas obligadas cromógenas	Alteraciones de color en alimentos como en pescados cocinados
<i>Vibrionaceae</i>	<i>Photobacterium</i>		Cocobacilos y bacilos luminiscentes	Presentes en carnes y pescados
	<i>Vibrio</i>		Presentes en agua salada y dulce, suelo y tracto digestivo de mamíferos	Patógenas
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>	Bacilo Gram-, coliforme	
	<i>Enterobacter</i>		coliforme	
	<i>Serratia</i>	<i>S. marcescens</i>		Produce coloraciones rojizas en la superficie de alimentos
	<i>Erwinia</i>			Patógenas de vegetales lesionan frutas y hortalizas
	<i>Yersinia</i>	<i>Y. pestis</i>		Causa la peste en el hombre, alteraciones de carnes, productos del mar y huevos produciendo toxiinfecciones alimentarias
	<i>Proteus</i>			
	<i>Shigella</i>			Producen disenterias bacilares, patologías del tracto respiratorio e intestinal en el humano como la neumonía bacteriana
	<i>Klebsiella</i>		Presencia de cápsula	
	<i>Salmonella</i>		entéricas	Producen infecciones alimentarias
<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcus</i>		Cocos, Gram+, aerobias, termodúricos	Temperatura óptima de crecimiento está entre los 25 y 30°C, pueden desarrollarse en salmueras, termodúricos, algunos dan coloraciones a los alimentos e incluso algunos crecen a temperatura de refrigeración
	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i>	Gram+	Muchas de las cepas son patógenas y producen una enterotoxina que causa intoxicaciones alimentarias
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>		Bacilos largos y delgados, microaerófilos, Gram+, fermentan azúcares dando ácido láctico	Importancia en la industria láctea para la producción de productos fermentados
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>S. pyogenes</i>	Homofermentativos	Origina en la especie humana faringitis séptica, escalatina y otras enfermedades, se encuentra en la leche
		<i>S. thermophilus</i>		Elaboración de quesos y en ciertas leches fermentadas
		<i>S. bovis</i>	Termodúricos	En leches pasteurizadas
		<i>S. lactisy S. cremoris</i>		Se emplean como fermentos para el queso, mantequilla

Tabla I (continuación). Bacterias deteriorativas en alimentos y de aplicación en la industria alimentaria.

Tipo de Microorganismos			Características	Importancia en la microbiología de los alimentos
Familia	Género	Especie		
		<i>S. faecalis</i> , <i>S. faecium</i>	Termodúricos	Toleran hasta 6.5% de sal, crecen a pH de 9.6 y su rango de temperatura de crecimiento va desde 5 hasta 50°C
	<i>Pediococcus</i>		Gram-negativos tolerantes a la sal	Salmueras, bebidas alcohólicas como la cerveza donde producen diacetilo
	<i>Leuconostoc</i>		Heterofermentativos	Fermentan el ácido cítrico de la leche y producen diacetilo
<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i>	Formadores de endoesporas, cuenta con especies mesófilas y termófilas	Alteran los alimentos vegetales enlatados, pan, lácteos y pastas
	<i>Clostridium</i>	<i>C. putrefaciens</i> , <i>C. perfringens</i> <i>C. butyricum</i>	Anaerobias o microaerófilas, pueden ser mesófilos o termófilos	Alteración gaseosa de las conservas vegetales

(A partir de Frazier y Westhoff, 1991; Adams y Moss, 1997)

al estado vegetativo rápidamente. Las endosporas se forman y nutren completamente dentro de una célula madre, la cual debe romper su membrana para liberar la espora al medio ambiente (McKenney, Driks y Eichenberger, 2013). Este proceso se revisará con detalle más adelante.

Los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina* y *Desulfotomaculum* son capaces de formar endoesporas. Para la microbiología de los alimentos los dos primeros tienen un interés especial debido a los problemas causados por algunas especies que forman parte de estos géneros. Actualmente se sabe que *B. cereus* es responsable de dos tipos distintos de enfermedad transmitida por alimentos: un síndrome diarreico, de aparición relativamente tardía y un síndrome emético de aparición rápida. No sólo esta especie de *Bacillus* se relaciona con enfermedades transmitidas por alimentos, se han aislado algunas otras especies como *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. pumilus* que han cobrado gran importancia debido al tipo de patología que producen (Scheldeman, Herman, Foster y Heyndrickx, 2006). Todas estas especies se encuentran ampliamente difundidas en suelo, agua y vegetales así como también se han identificado como componentes habituales de la microbiota temporal del intestino de las personas (Frazier y Westhoff, 1991; Adams y Moss, 1997; Jay, 2000).

Las hierbas secas y las especias que se utilizan en la condimentación pueden ser un origen importante de *B. cereus*. Los jugos y carne son vehículos de los demás bacilos causantes de intoxicaciones alimentarias. Productos horneados tales como el pan y los bollos blandos han sido implicados en varios brotes de intoxicación alimentaria por *B. subtilis*. Esta última especie es responsable del defecto conocido como pan viscoso,

en el que las esporas que resisten la cocción germinan y degradan la estructura interna de la hogaza produciendo una mucosidad pegajosa. Sin embargo, este defecto del pan no siempre impide que las personas se lo coman, por lo cual puede actuar como medio de transmisión de enfermedades (Frazier y Westhoff, 1991; Adams y Moss, 1997; Jay, 2000).

Otro microorganismo importante es *Clostridium frigidicarnis* el cual se ha aislado de carne de res en descomposición o que ha sido envasada al vacío. Este pertenece a un grupo de clostridios asociados con el deterioro de la carne roja refrigerada. Su crecimiento óptimo se produce entre 30 y 38.5°C (Broda, Lawson, Bell y Musgrave, 1999). Los clostridios entran en las plantas de procesamiento de carne, como esporas provenientes del suelo, la materia fecal, o de las pieles de los animales y son transferidos a la superficie de la carne durante la matanza y su procesamiento (Broda, Bell, Boerema y Musgrave, 2002; Boerema, Broda y Bell, 2003). La formación de endosporas que son muy resistentes es una característica de *C. frigidicarnis* y otros clostridios, lo cual hace de su eliminación una tarea muy difícil. Una estrategia potencial utilizada para tratar de eliminarlas es hacer germinar la endospora y luego aplicar algún método de procesamiento sobre la célula vegetativa, la cual es más sensible (Peck, 2009; Peck, Stringer, y Carter, 2011).

Clostridium difficile, miembro del mismo género, es la causa principal de las infecciones intestinales nosocomiales en el Reino Unido. La infección por *Clostridium difficile* se produce en pacientes susceptibles tras la ingestión de esporas presentes en un alimento contaminado, después de lo cual, el proceso irreversible de la germinación de las esporas se produce en el intestino delgado dando lugar a la formas vegetativas metabó-

licamente activas, las cuales producen las exotoxinas asociadas con la enfermedad (Poutanen y Simor, 2004; Moir, 2006).

De gran importancia también es el *Clostridium botulinum*, un grupo de cuatro clostridios relacionados fisiológica y filogenéticamente, que comparten en común la función de producir la neurotoxina botulínica considerada la toxina más potente conocida (Lund y Peck, 2000; Peck, 2009). Estos microorganismos son los responsables de la transmisión alimentaria del botulismo, una intoxicación en la que el consumo de alimentos que contengan tan poco como 30 ng de neurotoxina preformada, puede resultar en una enfermedad muy grave, y representan un peligro particular para la producción segura de alimentos mínimamente tratados mediante procesos térmicos o refrigerados (Peck, 2009; Peck, Stringer, y Carter, 2011). El tratamiento térmico aplicado a estos alimentos logra la eliminación de las células vegetativas, pero no las esporas bacterianas (Lund y Peck, 2000).

2. Las esporas

2.1. Proceso de esporulación

El proceso de esporulación se divide en siete estadios (McDonnell, 2007; Douglas y Dworkin, 2012) y es básicamente idéntico entre los géneros *Bacillus* y *Clostridium* (Fig. 1). Un crecimiento celular vegetativo normal se puede definir como fase cero con respecto a la esporulación, y es seguida por las etapas I/II, donde la célula vegetal inicia la división celular asimétrica y por tanto la formación de dos compartimentos separados por un tabique, el más pequeño de los cuales es denominado la preespora. La etapa II corresponde a la presentación del ADN de la célula como un filamento axial (Errington, 1993). Durante el estadio III, la preespora es endocitada por la célula madre para formar una célula distinta rodeada por las membranas interior y exterior. En la etapa IV se lleva a cabo la síntesis de la corteza de la espora, compuesta por peptidoglicano, entre las

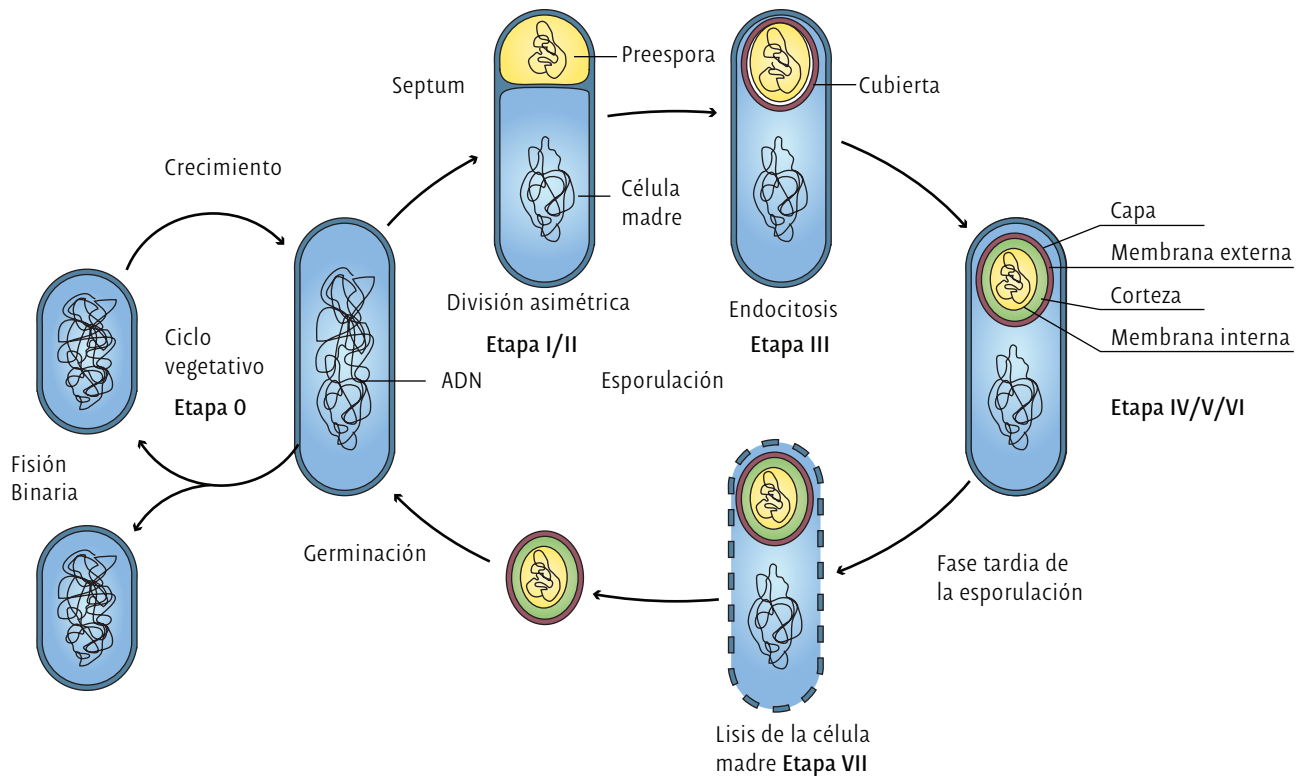


Fig. 1. La esporulación y el ciclo de germinación en *Bacillus subtilis*.
(Adaptado de McKenney, Peter, Driks y Eichenberger, 2012)

membranas interior y exterior de la preespora, y es seguida de la etapa V durante la cual se lleva a cabo la formación de la capa de la espora. Durante las etapas IV a VI, la célula madre también sintetiza una molécula específica de la espora que es muy abundante, ácido piridina-2,6-dicarboxílico [ácido dipicolínico (DPA)]. Esta se acumula en la preespora y está acompañada por una reducción de su contenido de agua. La maduración de la espora se lleva a cabo durante esta etapa, y se caracteriza porque el material de la capa se vuelve más denso en apariencia. En la etapa final (VII) se realiza la lisis de la célula madre y la liberación de la estructura de la espora madura. La estructura de la espora madura protege a los microorganismos inactivos de las condiciones desfavorables externas hasta que, una vez más, se vuelven favorables para el crecimiento celular vegetativo. La espora latente es entonces reactivada y se somete a la germinación y el crecimiento vegetativo (Leggett, McDonnell, Denyer¹, Setlow, y Maillard, 2012; Higgins y Dworkin, 2012).

2.2. Proceso de germinación

Las esporas de las especies de *Bacillus* pueden permanecer latentes por mucho tiempo y son extremadamente resistentes a una gran variedad de condiciones ambientales (Setlow y Johnson, 2007). La germinación de las esporas se ha relacionado con la presencia de moléculas específicas en el ambiente denominadas germinantes (Foster y Johnstone, 1990; Setlow, 2003). Los germinantes específicos que desencadenan la germinación de esporas varían entre las especies y son a menudo nutrientes necesarios para el crecimiento y la división celular (Adam, Brunt, Brightwell, Flint, y Peck, 2011). De tal forma que en condiciones apropiadas, cuando existe la unión de nutrientes específicos a los receptores de nutrientes germinantes de las esporas, por sus siglas en inglés GRS, las esporas pueden iniciar de nuevo un crecimiento activo a través de un proceso llamado germinación, seguido del crecimiento vegetativo (Paidhungat y Setlow, 2000; Paidhungat y Setlow, 2001; Setlow, 2003; Setlow y Johnson, 2007).

La transición de la espora a célula vegetativa implica tres fases distintas: la activación, la germinación y el crecimiento. La activación puede ser provocada por condiciones de calor, el pH o la exposición a sustancias químicas y hace que la espora entre en el proceso de germinación, por lo tanto rompe su estado de latencia (Leggett *et al.*, 2012). La activación es un proceso reversible que no necesariamente compromete a la espora en seguir con la germinación y el crecimiento, de tal forma que las esporas activadas conservan la mayoría de las propiedades que poseen las latentes (Foster y Johnstone 1990; Setlow 2003). En contraste, una vez que las esporas inician la

germinación, la espora ya no puede volver a su estado inactivo (Foster y Johnstone 1990; Setlow 2003). La germinación, como ya se trató en apartados anteriores, puede iniciarse en respuesta a diversos estímulos, que varían dependiendo de la especie. Estos incluyen, pero no están limitados a nutrientes metabolizables, tales como aminoácidos y azúcares específicos, como algunas especies iónicas, tensoactivos catiónicos y quelatos (en particular Ca^{+2} y DPA) y algunos tratamientos físicos tales como altas presiones (Setlow, 2008).

El crecimiento se define como todos los eventos de desarrollo que tienen lugar después de la germinación, incluyendo la iniciación del metabolismo y síntesis macromolecular (hinchazón de la espora), la emergencia (donde se desprenden las capas exteriores de las esporas) y el crecimiento de la nueva célula. Todo esto representa un retorno de la espora al crecimiento de las células vegetativas (Foster y Johnstone 1990; Setlow 2003).

2.3. Características de resistencia de las esporas

Como ya se ha hablado antes, las endosporas bacterianas sobreviven en condiciones extremas, por ejemplo, de calor y desecación debido al estado deshidratado del núcleo de la espora lo cual es debido, en gran parte, a la corteza. Esta estructura se compone de una forma de peptidoglicano que es similar, aunque no idéntico, al peptidoglicano de las células vegetativas, además cuenta con la presencia de residuos de ácido δ -lactámico murámico, resultantes en menos cadenas laterales de péptido y una reducción en el entrecruzamiento de las cadenas de glicanos (Higgins y Dworkin, 2012). La espora posee dos membranas distintas, separadas por la pared de la célula germinal y una capa muy fina de peptidoglicano que rodea la preespora. El ensamblaje del peptidoglicano de la espora se produce entonces en el espacio entre los dos membranas, esto como resultado de la acción de los genes expresados en el compartimento de la célula madre, incluida una codificación para la forma, el alargamiento, la división y la esporulación (Setlow, 2006; Higgins y Dworkin, 2012).

Se ha reportado que las esporas inactivas de diversas especies de *Bacillus* contienen una gran cantidad (10-20% del total de las proteínas de la espora) de proteínas pequeñas solubles en ácido, llamadas SASP por sus siglas en inglés, en su núcleo (Driks y Setlow, 2000). Estas SASP son de tres tipos α , β y γ . Estas proteínas se asocian con el ADN de las esporas, protegiéndolo de diversos tipos de daños (Setlow, 2000). Diversos estudios han demostrado que las SASP de los tipos α y β son factores importantes en la resistencia de las esporas ante varios agentes, incluyendo la radiación UV, formaldehído, ácido

nitroso y el calor seco y además, contribuyen significativamente a la resistencia de las esporas al calor húmedo y al peróxido de hidrógeno, así como la osmorresistencia (Setlow, 2000; Tovar-Rojo, Cabrera-Martínez, Setlow y Setlow, 2003). Además, todas las SASP juegan un papel en el inicio del crecimiento de las esporas por que proporcionan aminoácidos por su degradación temprana durante la germinación y la espora utiliza estos aminoácidos en el desarrollo de la célula para el metabolismo y la síntesis de proteínas (Setlow, 1998; Setlow, 2000).

De acuerdo con Setlow (2006), los factores importantes que confieren la resistencia química de la espora varían de acuerdo con el producto químico, pero en general incluyen: (i) las proteínas de la cubierta de la espora que probablemente reaccionan con los agentes químicos, (ii) la relativa impermeabilidad de la membrana interna de la espora que restringe el acceso de productos químicos exógenos al núcleo, (iii) la protección de ADN de la espora por su saturación con proteínas del tipo SASP y (iv) la activación de mecanismos de reparación del ADN ante los agentes que matan a la espora produciendo daños al ADN.

2.4. Estructura morfológica de las esporas

La espora de *B. subtilis* es una estructura compleja (Fig. 2). El núcleo de la espora contiene el ADN cromosómico que se mantiene en un estado compactado con las SASP. La membrana que

al principio del ciclo de formación de la espora rodeaba a la preespora, ahora rodea el núcleo y la corteza rica en peptidoglicano rodea esta membrana. Alrededor de la corteza, la capa de la espora consta de aproximadamente 80 proteínas depositadas por la célula madre dispuestas en dos capas: interior y exterior (Fig. 2). En algunas especies formadoras de esporas, excepto *B. subtilis*, la espora está rodeada de estructuras adicionales, tales como el exosporium y la capa S (Ghosh *et al.*, 2008). Ya que la estructura y composición química de la espora determina su resistencia es importante revisar con detenimiento estos aspectos. El exosporium es una gran estructura holgada encontrada sobre las esporas de algunas especies, en particular las del grupo de *Bacillus cereus* (Driks 2002; Waller, Fox, Fox, Fox, y Price, 2004.) Sin embargo, las esporas de muchas otras especies, incluyendo *B. subtilis*, o bien no contienen un exosporium, o si lo hacen, se reduce en tamaño. La capa de la espora es una estructura compleja compuesta de varias capas y contiene aproximadamente 50 proteínas en *B. subtilis* (Driks 2002; Lai *et al.* 2003). La cubierta es importante en la resistencia de las esporas de algunos productos químicos, a las enzimas líticas exógenas que pueden degradar la corteza de las esporas y a la depredación por protozoos, pero tiene poco o ningún papel en la resistencia de las esporas al calor, a la radiación u otros productos químicos (Nicholson, Munakata, Horneck, Melosh, y Setlow, 2000; Setlow, 2000).

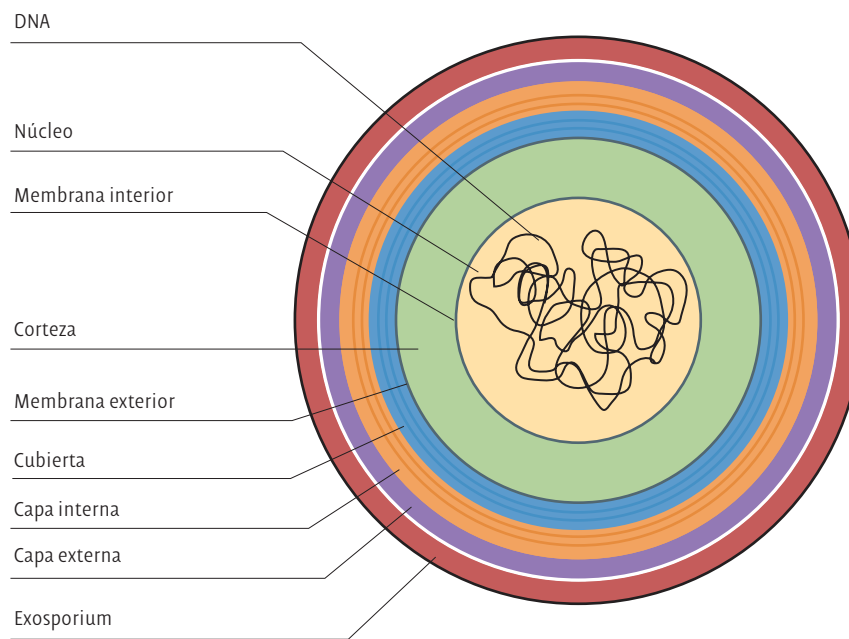


Fig. 2. Estructura morfológica de la espora.
(Adaptado de McKenney, Peter, Driks y Eichenberger, 2012)

La función precisa de la membrana externa, que se encuentra bajo la cubierta de la espora, no está clara, aunque esta membrana es una estructura esencial en la formación de las esporas. De hecho, la eliminación de la membrana exterior así como de proteínas de la cubierta de la espora no tiene ningún efecto notable sobre la resistencia de las esporas al calor, la radiación y algunos productos químicos (Nicholson et al., 2000; Setlow, 2000).

La corteza se compone de peptidoglicano con una estructura similar a la de la célula vegetativa, pero con varias modificaciones específicas de la espora. La corteza es esencial para la formación de una espora latente y para la reducción del contenido de agua de su núcleo. Sin embargo, el mecanismo por el que la corteza de la espora logra esta última protección no se conoce aún. En contraste, con la membrana externa de la espora, la membrana interior es una barrera contra la permeabilidad y desempeña un papel importante en la resistencia de la espora a muchos productos químicos, en particular, los que cruzan esta membrana para dañar al ADN. Dicha membrana interior está formada por moléculas de lípidos (Nicholson et al., 2000; Setlow 2000).

La parte más interna de la espora es el núcleo o "core". El núcleo contiene la mayor parte de las enzimas de la espora, así como ADN, ribosomas y ARNT. En casi todos los casos, las enzimas de la espora y ácidos nucleicos son idénticos a los de las células en crecimiento, aunque hay algunas macromoléculas únicas en el núcleo. También hay tres pequeñas moléculas cuyos niveles en el núcleo son importantes en la resistencia de las esporas. La primera es el agua, la cual es sólo el 27-55 % del peso húmedo del núcleo de la espora, dependiendo de la especie (Gerhardt y Marquis, 1989). La cantidad de agua libre en el núcleo de la espora es extremadamente baja, de tal forma que el movimiento macromolecular está muy restringido y es probablemente el factor más importante en la latencia enzimática de la espora, así como también determina la resistencia de la espora ante el calor húmedo (Gerhardt y Marquis, 1989). La segunda molécula es DPA. Esta molécula comprende el 5-15 % del peso seco de la espora en las especies de *Bacillus* y *Clostridium* y se encuentra sólo en el núcleo, donde está quelado con cationes divalentes, en gran parte de Ca^{2+} (Gerhardt y Marquis, 1989). El enorme depósito de DPA en el núcleo de la espora es responsable de la reducción del contenido de agua en esta parte durante la esporulación y juega un papel importante en la fotoquímica de luz UV del ADN de la espora. El tercer tipo de molécula es un grupo de proteínas pequeñas solubles en ácido (SASP) cuya función ya se ha tratado en el apartado anterior (Setlow, 1998).

2.5. Tipos de esporas según su resistencia

Como ya se ha discutido en apartados anteriores, las esporas pueden permanecer en un estado inactivo, siendo resistentes durante largos períodos de tiempo y puede volver a la vida rápidamente a través del proceso de la germinación. Durante la germinación la latencia de la espora y la resistencia extrema se pierden. Ya que los microorganismos son mucho más fáciles de eliminar, después de que hayan germinado, es ventajoso desencadenar la germinación de las esporas en los alimentos o el ambiente y, a continuación inactivar fácilmente las células vegetativas mucho más sensibles (Setlow, 2000).

Sin embargo, esta simple estrategia ha sido anulada en gran parte porque la germinación de las poblaciones de esporas es heterogénea. En general existen normoesporas, cuyo tiempo de germinación es normal y otras, denominadas superlatentes, que germinan demasiado lento y potencialmente pueden volver a la vida después de que los tratamientos para inactivar esporas germinadas se han aplicado, incluso después de días y hasta meses (Gosh y Setlow, 2009). Las poblaciones de esporas superlatentes se han aislado recientemente a partir de tres especies de *Bacillus*, y se han caracterizado sus propiedades de germinación (Gosh y Setlow, 2009; 2010). Casi todos los trabajos sobre los aspectos específicos de la germinación de las esporas de especies de *Bacillus* se ha centrado en la mayor parte de la población de las esporas y se ha prestado poca atención a la minoría que, o bien no logran germinar o germinan muy lentamente (Ghosh y Setlow, 2009).

Aunque las esporas superlatentes han sido, durante mucho tiempo, uno de los principales temas de preocupación en la industria de los alimentos, hasta hace poco había un escaso conocimiento de los factores específicos que determinan si una espora es superlatente y sus propiedades de germinación (Gosh y Setlow, 2010; Wei et al., 2010). Según estudios recientes, Gosh y Setlow (2009) reportaron que estas esporas superlatentes germinan muy mal con los germinantes originales, sin embargo, germinan razonablemente bien con mezclas de nutrientes que se dirigen a múltiples receptores de germinantes. En estudios realizados por estos investigadores, las esporas superlatentes se hicieron germinar con DPA o dodecilamina de Ca^{2+} , aunque según sus resultados, no lograron germinar con altos niveles de nutrientes que activan uno o dos receptores, sino con una mezcla de nutrientes que activan más receptores. Debido a estas características es muy poco probable que durante el procesamiento de los alimentos pueda dispararse la germinación de las esporas superlatentes, permaneciendo entonces de esta forma en los productos y pudiendo generar daños a los productos o a los consumidores.

3. Métodos de inactivación de esporas en alimentos

Debido a las amplias necesidades de producir alimentos seguros se ha desarrollado una gran variedad de métodos para su procesamiento. En general podemos hablar de tres tipos: físicos, químicos y otros dentro de los cuales podemos mencionar a las tecnologías emergentes.

3.1. Físicos

Se consideran métodos físicos de inactivación de microorganismos a aquellos que se basan en el uso de temperaturas y presiones modificadas para alterar alguna estructura de las células o las biomoléculas esenciales para su metabolismo. En la tecnología de alimentos los métodos más utilizados son los térmicos con calor húmedo, altas presiones y la deshidratación (Jay, 2000). Sin embargo, de estos métodos los únicos que reportan una inactivación de esporas son los de altas presiones e irradiación, por lo cual nos centraremos en los estudios realizados con estas tecnologías.

3.1.1. Procesamiento de alta presión

El procesamiento de alta presión parece tener un futuro prometedor para la conservación de alimentos, debido a las reducciones en las poblaciones microbianas que se puede lograr sin elevación significativa de la temperatura del producto. El uso de presiones que se acercan a 100,000 libras por pulgada cuadrada para tiempos de unos pocos minutos, produce un alimento procesado con el sabor, color y textura similar al fresco (Sánchez-Moreno, De Ancos, Plaza, Elez-Martínez y Cano, 2009). Zhang y Mittal (2008) reportan diversas condiciones con este tratamiento para la inactivación de esporas de diversas especies. Sin embargo, Kalchayanad, Dunneb, Sikes y Ray (2004) reportan que en jugos no se elimina a las esporas en condiciones de operación y según Lund y Peck (2000) también afirman que si bien no las elimina, las hace germinar por lo que serían susceptibles de otros tratamientos que podrían ser aplicados posteriormente.

Algunos estudios reportan que la presión a temperatura constante durante cierto tiempo puede desencadenar la actividad de la enzima lítica de la corteza (CLE) y causar la desactivación de esta enzima (Heinz y Knorr, 1998). Las reacciones de germinación se inician por la apertura de los canales de DPA (Paidhungat *et al.*, 2002) a presiones superiores a 500 MPa. A presiones mayores a 500 MPa una rehidratación parcial del núcleo sin actividad de la CLE (Setlow, 2003) podría inducir un efecto letal adicional. Uniendo todas las reacciones corres-

pondientes como efectos letales, un efecto letal acumulativo dependiente del nivel de presión aplicado podría generarse.

3.1.2. Irradiación

Las fuentes comunes de radiación ionizante son utilizando haz de electrones, infrarroja (IR), ultravioleta (UV), rayos X o rayos gamma (γ). Estos tratamientos generalmente funcionan al dañar el ADN de los organismos. Sin embargo, los efectos de la irradiación pueden afectar la calidad nutricional de los alimentos y varían dependiendo de los nutrientes, alimentos y condiciones de irradiación (dosificación, temperatura y condiciones atmosféricas). La seguridad de los alimentos irradiados, ha sido ampliamente probada. Sin embargo, sólo en los alimentos sometidos a las dosis más altas se ha reportado que pueden inactivarse esporas (Morehouse y Komolprasert, 2004).

Se ha estudiado que el efecto de la radiación infrarroja en la inactivación de esporas es debido a que la radiación IR se convierte rápidamente en calor, lo cual resulta en un calentamiento local intenso de las esporas (Mamouni, Tang, Wu, Vlahovic y Yang, 2011). Estos autores postulan la posibilidad de que el calor local extremo, en estrecho contacto con las esporas, dañe algunos de sus componentes y por lo tanto mejore la actividad antimicrobiana y dispare la germinación. La posible razón del crecimiento de células vegetativas después de tratamientos de IR aplicados a las esporas fue que los daños físicos parciales en las paredes de las esporas pueden desencadenar la germinación. Además, el calentamiento local sobre las esporas puede producir una abrasión mecánica provocando la germinación por la activación de las enzimas líticas de la corteza llamadas CwlJ y SleB (Dong, Tang, Wu, Vlahovic y Yang, 2013). Estas enzimas están presentes en la espora en una forma activa, pero no actúan hasta que son activados por el daño mecánico a las esporas o por estímulos de germinación como Ca^{2+} - DPA para la enzima CwlJ o algún otro estímulo para la enzima SleB. De tal forma que pueden dañar parcialmente la capa de la espora, por lo que es más permeable. Exámenes a nivel molecular mostraron que el tratamiento con IR alteró la expresión de los genes relacionados con la virulencia de *B. anthracis*, los cuales regulan la germinación (incluyendo la liberación de DPA) (Dong *et al.*, 2013).

Por otra parte, tanto los rayos UV como la radiación con rayos γ , matan a las esporas mediante la generación de daños en el ADN. El mecanismo de resistencia de las esporas a estas radiaciones y no se ha estudiado ampliamente, pero los estudios existentes reportan que no es debido a la unión de las SASP de los tipos α y β , por el contrario, la resistencia de las esporas a

ciertos tratamientos con radiación UV es en gran parte, debido a una alteración en la fotoquímica del ADN causado por la unión de SASP de los tipos α y β al ADN, y en menor medida a la acción fotosensibilizante del núcleo de la espora por su depósito de DPA (Setlow, 2006). Debido a su falta de acción enzimática y del metabolismo, la espora latente no puede reparar el daño a macromoléculas como el ADN o las proteínas. Por lo que la reparación del daño en el ADN se llevará a cabo cuando la espora vuelve a la vida en el proceso de la germinación y el crecimiento, cuando la actividad metabólica se reanuda (Setlow, 2003). Sin embargo, si el daño que se ha acumulado en las esporas durante la latencia es demasiado, este daño puede desbordar la capacidad de los sistemas de reparación y dar lugar a la muerte de la espora germinada (Setlow y Setlow, 1996; Tennen, Setlow, Davis, Loshon y Setlow, 2000).

3.2. Químicos

Debido a que los procesos físicos utilizados en la tecnología de alimentos para la inactivación de microorganismos pueden deteriorar la estructura del alimento, se ha recurrido al uso de agentes químicos para alterar o destruir a los microorganismos contaminantes de los alimentos y así evitar la producción de esporas. Dentro de los procesos químicos los más utilizados son la acidificación y el ahumado. Dichos procesos pueden generar un valor agregado al producto al modificar de manera favorable las características sensoriales del producto final. Sin embargo, estos tratamientos no son efectivos en la eliminación de esporas. Por estas razones se está buscando algunos otros químicos que pudieran lograr este objetivo sin modificar las características sensoriales de los alimentos o más aún, contribuir de manera positiva a ellas.

Las esporas son extremadamente resistentes a una variedad de productos químicos, incluyendo ácidos, bases, agentes oxidantes, agentes alquilantes, aldehídos y disolventes orgánicos. Como consecuencia, las esporas son a menudo los organismos más resistentes a los productos químicos descontaminantes diseñados para eliminar microorganismos. Afortunadamente, las esporas pueden destruirse por algunos tratamientos químicos. En algunos casos (por ejemplo, formaldehído, ácido nitroso, agentes alquilantes) el mecanismo de la muerte de esporas es posible a través de múltiples daños en el ADN, debido a que los supervivientes acumulan mutaciones en diversos genes sensibilizando a las esporas ante estos agentes. Sin embargo, esto sólo es cierto para unos pocos productos químicos genotóxicos a ciertas concentraciones y algunos agentes oxidantes tales como el peróxido de hidróge-

no que logran mutaciones en las células vegetativas, pero no lo hacen en las esporas (Setlow *et al.*, 1998; Tennen *et al.*, 2000; Cortezzo y Setlow, 2005).

Para algunos agentes químicos, incluyendo aldehídos grandes tales como glutaraldehído y orto-ftalaldehído, el mecanismo por el que se eliminan las esporas aún no está claro, aunque se sabe que estos dos productos químicos no matan a las esporas por daños en el ADN (Tennen *et al.*, 2000; Cabrera-Martínez, Setlow y Setlow, 2002). Tratamientos con ácidos fuertes matan a las esporas probablemente por la ruptura de la membrana interior la cual es una barrera de permeabilidad (Setlow *et al.*, 2002). Este también puede ser el mecanismo para matar esporas por disolventes orgánicos a temperaturas elevadas. Por el contrario, el tratamiento con un álcali fuerte, el cual se pensaba podía causar la muerte de las esporas, no las mata, ya que pueden ser reactivadas con un tratamiento adecuado con lisozima (Setlow *et al.*, 2002). El álcali parece inactivar a las enzimas líticas necesarias para la hidrólisis de la corteza de las esporas durante su germinación. Esta inactivación puede deberse a que estas enzimas se encuentran en las capas exteriores de la espora donde se considera que son más sensibles a los álcalis que otros componentes de la espora situados en las capas más internas (Setlow *et al.*, 2002).

3.3. Tecnologías emergentes

3.3.1. Plasma

Este método se ha reportado que inactiva tanto células vegetativas como endosporas bacterianas. Tres mecanismos básicos se han atribuido a la inactivación de las esporas. Estos incluyen la destrucción de ADN por irradiación UV, la volatilización de compuestos de la superficie de esporas por los fotones UV, y la erosión de la superficie de las esporas por la adsorción de especies reactivas como los radicales libres (Philip *et al.*, 2002). Efectos sinérgicos entre estos posibles mecanismos de inactivación se puede esperar, dependiendo de las condiciones operativas y el diseño del generador de plasma.

Investigaciones recientes incluyen la evaluación de la inactivación de los patógenos transmitidos por alimentos sembradas en películas delgadas de agar, las cuales se tratan con una descarga luminiscente de plasma (Kayes *et al.*, 2007) y también se pulveriza sobre la superficie de láminas de tereftalato de polietileno termo-sensible (PET), expuesto a una descarga de barrera dieléctrica (Muranyi, Wunderlich y Heise, 2007). Yu *et al.* (2006) han informado que altas cargas de *Escherichia coli* en membranas de policarbonato se ven afecta-

das adversamente con la penetración de especies en plasma y una alta eficacia de la inactivación microbiana se obtiene con este método. Se puede concluir que el plasma de baja temperatura (LTP) puede ser muy efectivo contra las células microbianas y esporas en las superficies y por otra parte se puede utilizar para la pasteurización no térmica y la esterilización de los alimentos según reportan Deng *et al.* (2007). El uso de la radiación con luz ultravioleta pulsante como un medio de inactivación microbiana es una tecnología madura que tiene aplicación comercial en la desinfección de superficies de embalaje de materiales (Anon, 2006), pero muestra limitaciones debido a los efectos secundarios en los productos alimenticios como pérdida de algunas características sensoriales (Gómez - López, Ragaert, Debevere y Devlieghere, 2007).

3.3.2. Procesos avanzados de oxidación

Estos procesos se basan en la generación de radicales hidroxil e incluyen luz UV/peróxido de hidrógeno, luz UV/ozono, rayos de electrones, sonólisis, fotocátalisis con dióxido de titanio y Reactivo de Fenton. Todos estos tratamientos se han reportado como altamente eficientes en la eliminación de microorganismos (Bandala, Castillo, González y Sanchez-Salas, 2011), en especial, se ha probado la reacción de Fenton para la eliminación de esporas en agua con resultados favorables (Bandala *et al.*, 2008). Sin embargo, los estudios para establecer si estos procesos pueden utilizarse ampliamente en otros alimentos, sin un posible cambio en las características sensoriales, aún están en desarrollo.

La mayoría de los agentes oxidantes eliminan a las esporas por causar algún tipo de daño a sus capas externas, principalmente a la membrana interna de la espora, de manera que cuando las esporas tratadas germinan, estas rupturas en la membrana dan como resultado su muerte (Young y Setlow, 2004a; Young y Setlow, 2004b; Shapiro, Setlow y Setlow, 2004). El tratamiento semiletal de las esporas con diversos agentes oxidantes también sensibiliza a las supervivientes para un tratamiento posterior (por ejemplo calor húmedo), ya que una membrana interior en buen estado le daría la resistencia completa a las esporas (Cortezzo, Koziol-Dube, Setlow y Setlow, 2004). Sin embargo, la naturaleza precisa de los daños de la membrana interna causada por agentes oxidantes aún no se conoce, aunque se ha demostrado que no es debido a la oxidación de los ácidos grasos insaturados (Setlow, 2006).

Conclusiones y comentarios finales

Desde los tratamientos térmicos, que fueron de las primeras tecnologías de conservación en los alimentos, hasta las actuales tecnologías emergentes tienen como objetivo el producir alimentos de alta calidad de inocuidad. Sin embargo, algunos microorganismos como los esporulados son resistentes a muchos de estos tratamientos. La mayoría de los tratamientos térmicos como la pasteurización han demostrado ser completamente ineficientes para la eliminación de esporas al igual que los procesos de deshidratación y algunos químicos como la acidificación. Por el contrario, existen reportes en tecnologías emergentes como altas presiones, irradiación y procesos avanzados de oxidación que demuestran su efectividad sobre esporas de algunos microorganismos como *B. subtilis* y sea por lograr eliminarlas o por disparar la germinación para después eliminarlas más fácilmente como células vegetativas por otros métodos. Algunos de los métodos que reportan la eliminación de esporas de algunas especies de bacterias como *B. subtilis* y *C. botulinum*, muestran limitaciones en cuanto a su uso en diferentes tipos de alimentos (sólidos o líquidos) y deberán probarse aún para verificar el impacto del proceso en cuanto a la manera en que se afectan el contenido de nutrientes y la calidad sensorial de éstos. Por tales motivos, se debe continuar la investigación en esta área para tratar de comprender los mecanismos que generan la resistencia de los microorganismos con el fin de desarrollar o adaptar las metodologías para lograr su eliminación efectiva de los alimentos.

Agradecimientos

La autora Luz del Carmen Huesca Espitia agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Universidad de las Américas Puebla (UDLAP) por el apoyo brindado para sus estudios de doctorado.

Referencias Bibliográficas

- Adams, M. R. y Moss, M. O. (1997). *Microbiología de los alimentos* (edición en lengua española). España: Ed. Acribia, S.A.
- Adam, K. H., Brunt, J., Brightwell, G., Flint, S. H. y Peck, M. W. (2011). Spore germination of the psychrotolerant, red

- meat spoiler, *Clostridium frigidicarnis*. *Letters in Applied Microbiology*, 53, 92-97.
- Anon. (2006). Six logs sterilization in pulsed UV tunnels from Steribeam. *Technology News International* 84, 84-85.
- Bandala, E. R., Castillo, J. H., González, L. y Sanchez-Salas, J. L. (2011). Solar driven advanced oxidation processes for inactivation of pathogenic microorganisms in water. *Recent Research and Development in Photochemistry Photobiology*, 8, 1-16.
- Bandala, E. R., Pérez, R., Velez-Lee, E. E., Sánchez-Salas, J. L., Quiroz, M. A. y Méndez-Rojas, M. A. (2008). *Bacillus subtilis* spore inactivation in water using photo-assisted Fenton reaction. *Sustainable Environmental Research*, 21(5), 285-290.
- Boerema, J. A., Broda, D. M. y Bell, R.G. (2003). Abattoir sources of psychrophilic clostridia causing blown pack spoilage of vacuum-packed chilled meats determined by culture-based and molecular detection procedures. *Letters in Applied Microbiology*, 36, 406-411.
- Broda, D. M., Bell, R. G., Boerema, J. A. y Musgrave, D. R. (2002). The abattoir source of culturable psychrophilic *Clostridium* spp. causing 'blown pack' spoilage of vacuum-packed chilled venison. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 817-824.
- Cabrera-Martinez, R.M., Setlow, B. y Setlow, P. (2002). Studies on the mechanism of the sporicidal action of ortho-phthalaldehyde. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 675-680. http://www.cdccgov.mmmwr.preview.mmmwrhtml.ss5510a1.htm?s_cid=ss5510a1_e
- CDC (Center for Disease Control and Prevention). (1996). Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with drinking unpasteurized commercial apple juice—British Columbia California Colorado and Washington October 1996. *MMWR Morb Mort Week Rep*, 45, 975.
- CDC (Center for Disease Control and Prevention). (1999). Outbreak of *Salmonella* serotype Muenchen infections associated with unpasteurized orange juice—United States and Canada June 1999. *MMWR Morb Mort Week Rep*, 48, 582-585.
- CDC (Center for Disease Control and Prevention). (2006). Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks—United States 1998-2002. *MMWR Morb Mort Week Rep*, 55(SS-10), 1-42.
- CDC (Center for Disease Control and Prevention). (2007). Cryptosporidiosis Surveillance—United States 2003-2005. *MMWR Surv Summ*, 56(SS07), 1-10.
- Cortezzo, D.E., Koziol-Dube, K., Setlow, B. and Setlow, P. (2004) Treatment with oxidizing agents damages the inner membrane of spores of *Bacillus subtilis* and sensitizes the spores to subsequent stress. *J Appl Microbiol*, 97, 838-852.
- Cortezzo, D.E. y Setlow, P. (2005). Analysis of factors influencing the sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* to DNA damaging chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 606-617.
- Deng, S., Ruan, R., Mok, C., Huang, G., Lin, X. y Chen, P. (2007). Inactivation of *Escherichia coli* on almonds using non-thermal plasmas. *Journal of Food Science*, 72(2), 62-66.
- Douglas, H. y Dworkin, J. (2012). Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation, *FEMS Microbiology Reviews*, 36, 131-148.
- Dong, X., Tang, Y., Wu, M., Vlahovic, B. y Yang, L. (2013). Dual effects of single-walled carbon nanotubes coupled with near-infrared radiation on *Bacillus anthracis* spores: inactivates spores and stimulates the germination of surviving spores. *Journal of Biological Engineering*, 7, 19-30.
- Driks, A. (2002). Overview: development in bacteria: spore formation in *Bacillus subtilis*. *Cellular and Molecular Life Science*, 59, 389-391.
- Driks, A. y Setlow, P. (2000). *Morphogenesis and properties of the bacterial spore*. En Ed. Brun, Y.V. y Shimkets, L.J., *Prokaryotic Development* (págs. 191-218). Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Errington, J. (1993). *Bacillus subtilis* sporulation - regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiological Reviews*, 57, 1-33.
- Floros, J. D., Newsome, F. W., Barbosa-Cánovas G. V., Chen, H., Dunne, C. P., German, J. B., Hall, R. L., Heldman, D. R., Karwe, M. V., Knabel, S. J., Labuza, T. P., Lund, D. V., Newell-McGloughlin, M., Robinson, J. L., Sebranek, J. G., Shewfelt, R. L., Tracy, W. F., Weaver, C. M. y Ziegler, G. R. (2010). Feeding the World Today and Tomorrow: The Importance of Food Science and Technology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 574-599.
- Foster, S.J. y Johnstone, K. (1990). Pulling the trigger: the mechanism of bacterial spore germination. *Molecular Microbiology*, 4, 137-141.
- Frazier, W. C. y Westhoff, D.C., (1991). *Microbiología de los alimentos*. España. Editorial Acribia S.A.
- Gerhardt, P. y Marquis, R. E. (1989). Spore thermoresistance mechanisms. En *Regulation of Prokaryotic Development*. Ed. Smith, I., Slepecky, R.A. y Setlow, P. (págs. 43-63). Washington, DC: American Society for Microbiology.

- Ghosh, S., Setlow, B., Wahome, P. G., Cowan, A. E., Plomp, M., Malkin, A. J. y Setlow, P. (2008). Characterization of spores of *Bacillus subtilis* that lack most coat layers. *Journal of Bacteriology*, 190, 6741-6748.
- Ghosh, S. y Setlow, P. (2009). Isolation and Characterization of Superdormant Spores of *Bacillus* Species. *Journal of Bacteriology* 191(6), 1787-1797.
- Ghosh, S. y Setlow, P. (2010). The preparation, germination properties and stability of superdormant spores of *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 582-590.
- Gomez-Lopez, V. M., Ragaert, P., Debevere, J. y Devlieghere, F. (2007). Pulsed light for food decontamination: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 464-473.
- Heinz, V. y Knorr, D. (1998). High pressure germination and inactivation kinetics of bacterial spores. En N.S. Isaacs, *High Pressure Food Science, Bioscience and Chemistry* (págs. 435-441). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Higgins, D. Dworkin, J. (2012), Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiology Reviews*, 36, 131-148.
- Hoornstra, E. y Notermans, S. (2001). Quantitative microbiological risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*, 66, 21-9.
- Jay, J. M. (2000). *Microbiología moderna de los alimentos* (4a. edición). España: Editorial Acribia, S.A.
- Kalchayanand N., Dunneb P., Sikes A., Ray B. (2004). Viability loss and morphology change of foodborne pathogens following exposure to hydrostatic pressures in the presence and absence of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 91-98.
- Kayes, M. M., Critzer, F. J., Kelly-Wintenberg, K., Roth, J. R., Montie, T. C. y Golden, D. A. (2007). Inactivation of foodborne pathogens using a one atmosphere uniform glow discharge plasma. *Foodborne Pathogens and Disease*, 4, 50-59.
- Lai, E. M., Phadke, N. D., Kachman, M. T., Giorno, R., Vazquez, S., Vazquez, J. A., Maddock, J. R. y Driks, A. (2003). Proteomic analysis of the spore coats of *Bacillus subtilis* and *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology*, 185, 1443-1454.
- Leggett, M. J., McDonnell, G., Denyer, S. P., Setlow, P. y Mailard, J.-Y. (2012). Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 485-498.
- Lund, B. M. y Peck, M. W. (2000). *Clostridium botulinum*. En Lund, B.M., Baird-Parker, A.C. and Gould, G.W., *The Microbiological Safety and Quality of Food* (págs. 1057-1109). Gaithersburg, USA: Aspen.
- Mamouni, J., Tang, Y., Wu, M., Vlahovic, B. y Yang, L. (2011). Single-walled carbon nanotubes couples with near-infrared laser for inactivation of bacterial cells. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 11, 4708-4716.
- McDonnell, G. E. (2007). *Antisepsis, disinfection and sterilization: types, action, and resistance*. Washington, DC. American Society for Microbiology.
- McKenney, P. T., Driks, A. y Eichenberger, P. (2013). The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews in Microbiology*, 11, 33-44.
- McMeekin, T., Bowman, J., McQuestin, O., Mellefont, L., Ross, T. y Tamplin, M. (2008). The future of predictive microbiology: Strategic research innovative applications and great expectations. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 2-9.
- Moir, A. (2006). How do spores germinate?. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 526-530.
- Morehouse, K. M. y Komolprasert, V. (2004). Irradiation of food and packaging: an overview. En: Komolprasert, V., Morehouse, K.M., *Irradiation and food packaging: recent developments*. (ACS Symposium Series 875, págs. 1-11). Washington, DC: American Chemical Society.
- Muranyi, P., Wunderlich, J. y Heise, M. (2007). Sterilization efficiency of a cascaded dielectric barrier discharge. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1535-1544.
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J. and Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 548-572.
- Paidhungat, M., y Setlow, P. (2000). Role of Ger proteins in nutrient and nonnutrient triggering of spore germination in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 182, 2513-2519.
- Paidhungat, M. y Setlow, P. (2001). Localization of a germinant receptor protein (GerBA) to the inner membrane of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology*, 183, 3982-3990.
- Paidhungat, M., Setlow, B., Daniels, W.B., Hoover, D., Papafragkou, E. y Setlow, P. (2002). Mechanisms of induction of germination of *Bacillus subtilis* spores by high pressure. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 3172-3175.
- Peck, M. W. (2009). Biology and genomic analysis of *Clostridium*

- ium botulinum*. *Advances in Microbial Physiology*, 55, 183-265.
- Peck, M. W., Stringer, S. C. y Carter, A. T. (2011). *Clostridium botulinum in the post-genomic era*. *Food Microbiology*, 28, 183-191.
- Philip, N., Saoudi, B., Crevier, M., Moisan, M., Baarbeau, J. y Pelletier, J. (2002). The respective roles of uv photons and oxygen atoms in plasma sterilization at reduced gas pressure: The case of N₂/O₂ mixtures. *IEEE Transactions in Plasma Science*, 30, 1429-1436.
- Poutanen, S. M. y Simor, A. E. (2004). *Clostridium difficile* associated diarrhea in adults. *Canadian Medical Association Journal*, 171, 51-58.
- Sanchez-Moreno, C, De Ancos, B, Plaza, L, Elez-Martinez, P, Cano, M.P. (2009). Nutritional approaches and health-related properties of plant foods processed by high pressure and pulsed electric fields. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49, 552-76.
- Scheldeman, P., Herman, L., Foster, S., Heyndrickx, M. (2006). *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat resistant spore formers in milk. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 545-555.
- Setlow, B. y Setlow, P. (1996) Role of DNA repair in *Bacillus subtilis* spore resistance. *Journal of Bacteriology*, 178, 3486-3495.
- Setlow, B., Tautvydas, K.J. and Setlow, P. (1998) Small, acidsoluble spore proteins of the α/β -type do not protect the DNA in *Bacillus subtilis* spores against base alkylation. *Applied Environmental Microbiology*, 64, 1958-1962.
- Setlow, B., Loshon, C.A., Genest, P.C., Cowan, A.E., Setlow, C. y Setlow, P. (2002) Mechanisms of killing of spores of *Bacillus subtilis* by acid, alkali and ethanol. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 362-375.
- Setlow, P. (1998). Small acid-soluble, spore proteins of *Bacillus* species: structure, synthesis, genetics, function and degradation. *Annual Review of Microbiology*, 42, 319-338.
- Setlow, P. (2000). Resistance of bacterial spores. En Ed. Storz, G. and Hengge-Aronis, R., *Bacterial Stress Responses* (págs. 217-230). Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Setlow, P. (2003). Spore germination. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 550-556.
- Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 514-525.
- Setlow, P. (2008). Dormant spores receive an unexpected wakeup call. *Cell*, 135, 410-412.
- Setlow, P. y Johnson, E. A. (2007). Spores and their significance (3ª. Edición). En M. P. Doyle and L. R. Beuchat, *Food microbiology: fundamentals and frontiers* (págs. 35-67). Washington, DC. ASM Press.
- Shapiro, M., Setlow, B. y Setlow, P. (2004). Studies on the killing of spores of *Bacillus subtilis* by a modified Fenton reagent containing CuCl₂ and ascorbic acid. *Applied Environmental Microbiology*, 70, 2535-2539.
- Tennen, R., Setlow, B., Davis, K.L., Loshon, C.A. y Setlow, P. (2000). Mechanisms of killing of spores of *Bacillus subtilis* by iodine, glutaraldehyde and nitrous acid. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 330-338.
- Tovar-Rojo, F., Cabrera-Martinez, R.M., Setlow, B. y Setlow, P. (2003). Studies on the mechanism of the osmoresistance of spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 167-179.
- Waller, L.N., Fox, N., Fox, K.F., Fox, A. y Price, R.L. (2004). Ruthenium red staining for ultrastructural visualization of a glycoprotein layer surrounding the spore of *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiological Methods*, 58, 23-30.
- Wei, J., Shah, I. M., Ghosh, S., Dworkin, J., Hoover, D. G. y Setlow, P. (2010). Superdormant spores of *Bacillus* species germinate normally with high pressure, peptidoglycan fragments, and bryostatin. *Journal of Bacteriology*, 192, 1455-1458.
- Young, S.B. y Setlow, P. (2004a) Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by Decon and Oxone™, two general decontaminants for biological agents. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 289-301.
- Young, S.B. y Setlow, P. (2004b) Mechanisms of *Bacillus subtilis* spore resistance to and killing by aqueous ozone. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 1133-1142.
- Yu, H., Perni, S., Shi, J. J., Wang, D. Z., Kong, M. G. y Shama, G. (2006). Effects of cell surface loading and phase of growth in cold atmospheric gas plasma inactivation of *Escherichia coli* K12. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 1364-5072.
- Zhang H y Mittal G. (2008). Effects of High-Pressure Processing (HPP) on Bacterial Spores: An Overview. *Food Reviews International*, 24, 330-351.