



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

Expresión del factor σ^B y resistencia a los tratamientos térmicos de *Staphylococcus aureus*: influencia de la temperatura y el tiempo de crecimiento celular

Relationship between σ^B activity and heat resistance in *Staphylococcus aureus* cells: influence of growth phase and temperature

Autor/es

Laura Nadal Calvo

Director/es

M^a Pilar Mañas Pérez y Guillermo Cebrián Auré

Facultad de Veterinaria

2018

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Tratamientos térmicos en la industria alimentaria.....	3
1.2. Factores generales que determinan la resistencia microbiana al calor.....	5
1.2.1. Fase de crecimiento de los microorganismos.....	5
1.2.1.1. Influencia de la expresión del factor sigma σ^B	6
1.2.2. Temperatura de crecimiento de los microorganismos.....	7
1.2.2.1. Influencia de las proteínas de choque térmico.....	8
1.2.2.2. Influencia de la fluidez de la membrana citoplasmática.....	8
1.3. Antecedentes en <i>Staphylococcus aureus</i>	10
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	13
3. METODOLOGÍA	14
3.1. Microorganismo.	14
3.2. Medios de cultivo y de tratamiento.	14
3.3. Suspensiones de trabajo.....	14
3.4. Curvas de crecimiento.....	15
3.5. Preparación de las muestras para inoculación en el termorresistómetro.	15
3.6. Determinaciones de resistencia al calor.....	16
3.7. Incubación y recuento de supervivientes.....	17
3.8. Elaboración de gráficas de supervivencia y modelización de las mismas.....	17
3.9. Cálculo de los parámetros de resistencia y análisis estadístico.	18
3.10. Preparación de las muestras para el análisis de ácidos grasos.....	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4.1. Curvas de crecimiento de <i>S. aureus</i> Newman a diferentes temperaturas.	20
4.2. Influencia del tiempo y la temperatura de incubación en la termorresistencia de <i>S. aureus</i> Newman.....	21
4.3. Composición en ácidos grasos de la membrana de <i>S. aureus</i> Newman y relación con la termorresistencia.	27
5. CONCLUSIONES	33
CONCLUSIONS	34
6. APORTACIONES EN MATERIA DE APRENDIZAJE.....	35
7. BIBLIOGRAFÍA	36
ANEXO	39

RESUMEN

El calor es una tecnología ampliamente utilizada por la industria alimentaria con el objetivo de inactivar microorganismos patógenos y alterantes. Sin embargo, actualmente aún existe cierto desconocimiento acerca de los factores que influencian la inactivación bacteriana por calor, su modo de acción y las respuestas bacterianas que podrían desarrollarse para aumentar la termotolerancia. Por ello, es necesario realizar una investigación más profunda, puesto que la mejora de la eficacia de los métodos que se utilizan en la industria alimentaria para la inactivación microbiana, así como el diseño de procesos más efectivos, depende en gran parte de la adquisición de este conocimiento.

En este trabajo se ha estudiado la influencia de la temperatura y tiempo de incubación en la termorresistencia y en la composición de los ácidos grasos de la membrana citoplasmática de *Staphylococcus aureus*. Además, se ha analizado la posible relación entre termorresistencia, composición de la membrana citoplasmática y expresión del factor σ^B , que se expresa tras la entrada en fase estacionaria.

Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que tanto un incremento en la temperatura como en el tiempo de incubación, supone un incremento en la termotolerancia de *S. aureus*. Así, los datos relativos a la influencia del tiempo de incubación sugieren que el factor σ^B juega un importante papel en el desarrollo de termorresistencia, aunque tendría que probarse la existencia de una relación directa entre actividad σ^B y termorresistencia. Por otra parte, conforme aumenta la temperatura de cultivo, disminuye la proporción de ácidos grasos ramificados en la membrana de *S. aureus*, y aumenta la de saturados. Sin embargo, la entrada en fase estacionaria de crecimiento produce el efecto contrario. Consecuentemente, no se pudo establecer una relación directa entre termorresistencia y composición de ácidos grasos de membrana, salvo al comparar únicamente células obtenidas en la misma fase de crecimiento.

ABSTRACT

Heat is a technology widely used by the food industry with the aim of inactivating pathogenic and spoilage microorganisms. Nonetheless, currently there is still a lack of knowledge about the factors that influence the bacterial inactivation by heat, its mode of action, and the bacterial responses that could be developed to increase thermotolerance, among other aspects. Because of that fact, it is necessary to carry out a deeper investigation, since the improvement of the efficiency of the methods used by the food industry to inactivate microorganisms, as well as the design of more effective processes, largely depends on the acquisition of this knowledge.

In this work, the influence of the incubation temperature and time in the thermoresistance and in the membrane fatty acid composition of *Staphylococcus aureus*, has been studied. Furthermore, the possible relationship between thermoresistance, composition of the cytoplasmic membrane and expression of σ^B factor has been analyzed.

The results obtained in this investigation show that both factors, an increase in temperature and in incubation time, provoke an increase in the thermotolerance of *S. aureus*. Thus, according to the data obtained after different incubation time the σ^B factor would play an important role in the development of thermoresistance, although the existence of a direct relationship between σ^B activity and thermoresistance still has to be proven. On the other hand, as the incubation temperature increases, the proportion of branched fatty acids in the cytoplasmic membrane of *S. aureus* decreases, and that of saturated increases. Notwithstanding, entry into the stationary phase of growth causes the opposite effect. Consequently, a direct relationship between thermoresistance and membrane fatty acid composition could not be established, except when comparing cells obtained in the same growth phase.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Tratamientos térmicos en la industria alimentaria.

El calor es una tecnología ampliamente utilizada para tratar alimentos. Por un lado, se encuentran los tratamientos térmicos de pasterización, cuyo objetivo principal es la inactivación de células vegetativas de microorganismos patógenos. En este caso, se emplean temperaturas por debajo de los 100 °C y los alimentos tratados han de conservarse en refrigeración. Existen diferentes variantes en los tratamientos de pasterización, aunque los más habituales son los LT LT (temperaturas bajas, tiempos prolongados) y los HT ST (temperaturas altas, tiempos cortos) (Casp y Abril, 2003).

Por otro lado, los tratamientos de esterilización garantizan la eliminación de células vegetativas y esporas, así como la de la mayoría de enzimas y toxinas presentes en el alimento. Para ello, se utilizan temperaturas elevadas, por encima de los 100 °C, y en este caso, los productos son estables a temperatura ambiente durante largos períodos de tiempo. Asimismo, existen variantes en los tratamientos de esterilización. Tradicionalmente, se realizaban esterilizaciones de tiempos prolongados, sin embargo, existen modalidades como la UHT, en la que se combinan temperaturas muy elevadas con tiempos de tratamiento del orden de unos pocos segundos. Utilizar tiempos cortos de tratamiento conlleva beneficios, puesto que la calidad del producto se ve mínimamente afectada a la vez que se consigue una eficiente inactivación microbiana (Casp y Abril, 2003).

La intensidad del tratamiento térmico que se aplica a un determinado producto puede calcularse matemáticamente. La relación que existe entre el número de microorganismos supervivientes al calor y el tiempo de tratamiento es de tipo exponencial. La termorresistencia microbiana se expresa habitualmente con el valor D_t , que se corresponde con el tiempo en minutos, a una temperatura determinada, necesario para reducir la población microbiana un ciclo logarítmico (Figura 1.1.).

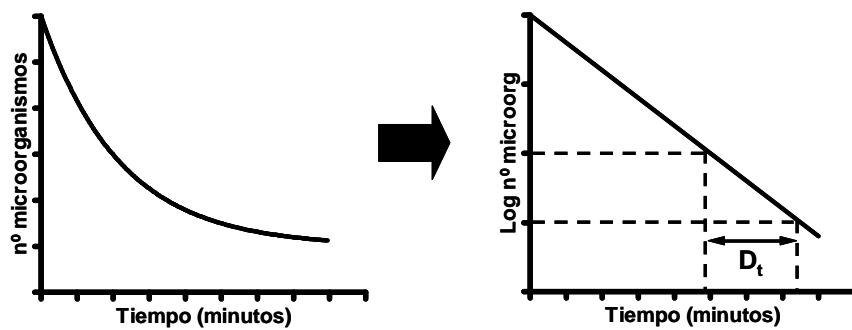


Figura 1.1. Influencia del tiempo de tratamiento en la supervivencia microbiana al calor: Gráfica de supervivencia.

Otro valor frecuentemente empleado en la determinación de la termorresistencia de microorganismos es el valor z , que se define como el número de grados que se debe incrementar la temperatura para conseguir reducir un ciclo logarítmico el valor D_t (Figura 1.2.).

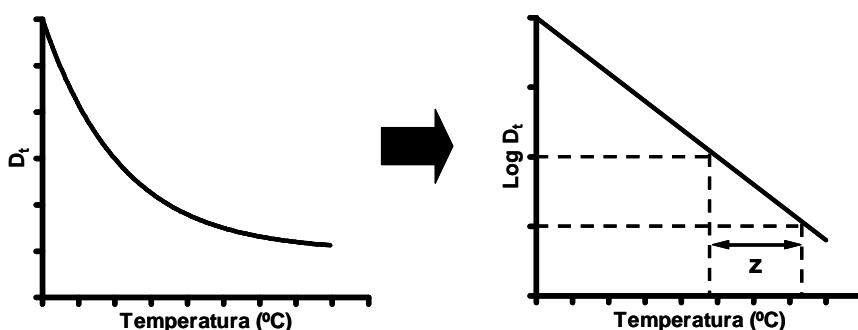


Figura 1.2. Influencia de la temperatura de tratamiento en la velocidad de inactivación microbiana por el calor.

Según se ha descrito, el calor es capaz de dañar diversos componentes y estructuras celulares como por ejemplo el ADN, ARN y ribosomas. Además, puede provocar desnaturización proteica y afecta de manera importante a las envolturas celulares, en especial a la membrana citoplasmática (Smelt y Brul, 2014; Cebrián, Condón y Mañas, 2017).

A pesar de que los tratamientos térmicos son frecuentemente utilizados por la industria alimentaria con el objetivo de inactivar tanto microorganismos patógenos como alterantes, actualmente aún existe cierto desconocimiento sobre los factores que influencian la inactivación bacteriana por calor, su modo de acción, las cinéticas de inactivación y las respuestas que las bacterias podrían desarrollar para aumentar su tolerancia al calor, entre otros aspectos.

Es fundamental por lo tanto seguir investigando y realizando estudios para conocer con la mayor precisión y profundidad posible todos aquellos aspectos relacionados con la inactivación microbiana por calor. Actualmente, estas investigaciones aún adquieren más relevancia, ya que los consumidores requieren productos menos procesados, con características semejantes a las de los frescos. Esto conlleva la necesidad de una disminución en la intensidad de los tratamientos, para lo cual se deben conocer mejor todos los factores implicados, con el fin de poder diseñar procesos que permitan garantizar la seguridad alimentaria (Abee y Wouters, 1999).

1.2. Factores generales que determinan la resistencia microbiana al calor.

Existe una gran diversidad de factores que influyen en la termorresistencia microbiana, y se pueden clasificar en previos, simultáneos y posteriores al tratamiento térmico aplicado. Los factores más relevantes que actúan con anterioridad al tratamiento son la fase y temperatura de crecimiento de los microorganismos, la composición y características del medio de crecimiento, y la exposición a temperaturas subletales o a otros estreses previos al tratamiento. Como factores que actúan durante el tratamiento cabe destacar la composición, el pH, la actividad de agua (a_w) y el potencial redox (E_h) del medio de tratamiento. En el caso de los factores que actúan después, los más importantes son el tiempo y la temperatura de incubación, la composición del medio de recuperación, y sus características físico-químicas (Cebrián, 2009).

De todos los factores enumerados, este trabajo se centra en la fase y la temperatura de crecimiento de los microorganismos, cuya influencia se describe a continuación.

1.2.1. Fase de crecimiento de los microorganismos.

A lo largo de una curva de crecimiento microbiana, se pueden apreciar distintas fases (Figura 1.3.). En primer lugar, comenzaría la fase de latencia (o fase lag), al inocular el microorganismo en el medio de crecimiento. Esta fase tiene una duración variable, dependiente de multitud de factores y se corresponde con un periodo de aclimatación al nuevo medio (Cebrián, 2009).

Posteriormente, comienza la fase de crecimiento exponencial, durante la cual las células se dividen consecutivamente para dar lugar a células idénticas a sus progenitoras. El número de células se incrementa rápidamente en esta etapa siguiendo un ritmo exponencial, lo que conlleva un agotamiento progresivo de los nutrientes, que a su vez conducirá a una disminución de la velocidad de duplicación celular y a la entrada en fase estacionaria de

crecimiento. La actividad metabólica de las células se ve reducida horas después de dicha entrada en la fase estacionaria, de forma variable según el grupo celular. Con el aumento del tiempo de incubación, las células comienzan a morir, y el cultivo pasará a entrar en la fase de autoesterilización (Cebrián, 2009).

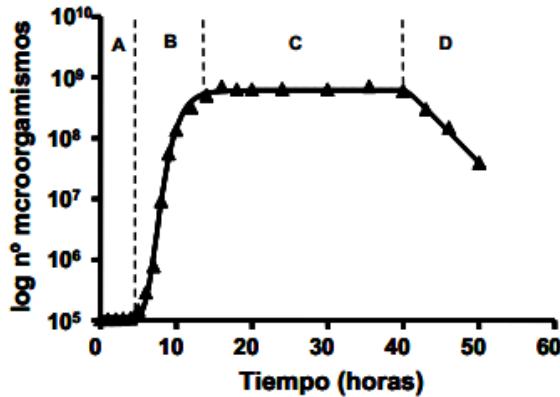


Figura 1.3. Gráfica de crecimiento microbiana. A: Fase de latencia. B: Fase de crecimiento exponencial. C: Fase estacionaria. D: Fase de autoesterilización (Cebrián, 2009).

En cuanto a la influencia de la fase de crecimiento en la termorresistencia microbiana, se ha descrito que las células en fase exponencial de crecimiento presentan, por lo general, menor resistencia frente al calor que aquellas que se encuentran en fase estacionaria (Cebrián, Condón y Mañas, 2017). Asimismo, se ha demostrado que en fase de latencia las células presentan una mayor termorresistencia que en fase exponencial, incluso llegando a superar la de la fase estacionaria (Lemcke y White, 1959).

1.2.1.1. Influencia de la expresión del factor sigma σ^B .

En diversos géneros microbianos, la existencia de varias subunidades de reconocimiento, conocidas como factores sigma (σ), de la ARN polimerasa, es el sistema más importante de regulación de la expresión génica, y por consiguiente, del desarrollo de resistencias frente a estreses medioambientales (Abee y Wouters, 1999). Hoy en día se conoce que una de las principales causas de la mayor termorresistencia de las células en fase estacionaria de crecimiento es la expresión de factores sigma alternativos (Cebrián, Condón y Mañas, 2017).

Los genes que se transcriben en las células dependen del factor σ que se encuentre unido a la ARN polimerasa. Asimismo, el factor que se encuentre unido en un momento concreto, dependerá de la fase de crecimiento microbiana y de determinados estímulos externos. Este sistema de regulación es muy complejo, y aún desconocido en gran parte. El factor σ^B de las especies Gram-positivas está considerado como un factor σ alternativo de fase estacionaria y

presenta ciertas analogías con el factor σ^S de las Gram-negativas. El factor σ^B se encuentra involucrado en la respuesta frente a diversos estreses como el calor, la hiperosmolaridad, los pHs extremos, las altas concentraciones de etanol o la presencia de agentes oxidantes. Además, se ha demostrado su influencia en la resistencia de microorganismos a diferentes antibióticos y en la expresión de los factores de virulencia (Cebrián, 2009).

Existen varios motivos que permitirían explicar las diferencias en termorresistencia observadas entre las distintas fases de crecimiento. Entre ellos, se encuentran el cambio en el perfil de ácidos grasos de membrana, el engrosamiento de la pared celular y la síntesis de chaperones, proteasas y enzimas eficaces frente a las especies reactivas del oxígeno (Beuchat, 1978; Kolter, Siegele y Tormo, 1993). Gran parte de dichos cambios es debida al aumento de la expresión de los factores σ de fase estacionaria σ^B y σ^S (Cebrián, 2009).

Varios fenómenos se han señalado como responsables de la activación de los factores σ^S y σ^B . En el caso de σ^B en *S. aureus*, microorganismo utilizado en este estudio, se ha propuesto que la inducción podría ser provocada por la limitación de nutrientes y energía, o por el calor, entre otros (Senn et al., 2005; Cebrián et al., 2009).

1.2.2. Temperatura de crecimiento de los microorganismos.

Otro de los factores más influyentes en la termorresistencia microbiana es la temperatura de crecimiento de los microorganismos. Generalmente, se afirma que los microorganismos termófilos presentan una mayor termorresistencia que los mesófilos y éstos a su vez, que los psicrófilos (Jay, 1992).

Además, dentro de una misma especie microbiana, la termorresistencia aumenta con la temperatura de cultivo. Este hecho se ha demostrado en una gran diversidad de especies de interés en alimentos, incluyendo *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica* (Cebrián, Condón y Mañas, 2017). Se debe tener en cuenta que dicho aumento de termorresistencia sólo se cumple dentro de un rango específico de temperaturas de cultivo, al sobrepasarse ese rango, habitualmente la termotolerancia disminuye. La máxima termorresistencia microbiana suele alcanzarse a temperaturas mayores de las óptimas de crecimiento (Cebrián, 2009).

Los componentes o estructuras celulares relacionados con el aumento de termorresistencia provocado por el incremento de la temperatura no se han descrito con precisión, si bien

destacan el posible papel de las proteínas de choque térmico y de las modificaciones en la fluidez de la membrana citoplasmática.

1.2.2.1. Influencia de las proteínas de choque térmico.

Las proteínas de choque térmico (HSPs, del inglés Heat Shock Proteins) poseen funciones estabilizadoras y reparadoras de diferentes estructuras microbianas. Asimismo, se ha descrito que muchas de estas proteínas juegan un papel relevante en la resistencia al calor (Schumann, 2007), habiéndose observado incluso que su deficiencia imposibilita el crecimiento de los microorganismos a temperaturas elevadas (Fayet et al., 1989).

Las variaciones en la temperatura de crecimiento de microorganismos inducen cambios en el perfil proteico. Con la exposición de los microorganismos a condiciones de estrés subletales (como temperaturas subletales, cercanas a las máximas de crecimiento) aumentan los niveles celulares de las HSPs. Por consiguiente, se ha observado una mayor termorresistencia en células que han crecido a temperaturas más elevadas, debido, al menos en parte, a cambios en el perfil proteico (Schumann, 2007).

1.2.2.2. Influencia de la fluidez de la membrana citoplasmática.

La membrana citoplasmática de las células procariotas consiste en una bicapa lipídica de unos 7-8 nm de espesor, constituida principalmente por fosfolípidos, y en la que se encuentran embebidas diferentes proteínas, de acuerdo con el modelo del mosaico fluido, descrito por Singer y Nicholson (1972). La bicapa lipídica, en condiciones fisiológicas normales, se encuentra en estado líquido-cristalino. Dicho estado, es el considerado como biológicamente activo o funcional, en el que los fosfolípidos son capaces de realizar movimientos. La transición al estado gel puede conllevar modificaciones en la permeabilidad transmembrana, alteraciones en la funcionalidad de las proteínas, en la hidrofobicidad, o en la resistencia mecánica, entre otros efectos (Denich et al., 2003).

La fluidez de la membrana es básicamente una medida del grado de empaquetamiento de las moléculas lipídicas de su interior. El factor más influyente en la fluidez es la composición de la membrana, sobre todo en ácidos grasos. Los cambios en los grupos polares de los fosfolípidos de la membrana también pueden dar lugar a variaciones en su fluidez, aunque este fenómeno es menos común y eficiente que las modificaciones en los ácidos grasos (Cebrián, 2009).

Por lo que respecta a la composición en ácidos grasos (Figura 1.4.), se ha demostrado que la presencia de ácidos grasos insaturados fluidifica la membrana, debido a los dobles enlaces. Cabe resaltar que la magnitud del efecto fluidificante varía en función del tipo y número de insaturaciones que posean. Así, la temperatura de transición de las membranas con elevada presencia de ácidos grasos insaturados será inferior que la de las membranas con mayor proporción de ácidos grasos saturados. Además, el efecto fluidificante es mayor en el caso de los ácidos grasos *cis* insaturados que en el de los *trans* y es aún mayor el efecto de los poliinsaturados (Cebrián, 2009).

Los ácidos grasos ramificados con grupos metilo son exclusivos de las bacterias Gram-positivas. La ramificación es debida a la introducción de un grupo metilo, que provoca un incremento en la fluidez de la membrana. Dicha fluidez es superior si el grupo metilo se encuentra en la posición anteiso (antepenúltimo carbono), en comparación a la ramificación en posición iso (penúltimo carbono) (Russell, 1995). Por otro lado, los ácidos grasos cíclicos, o con anillo de ciclopropano, se sintetizan por modificación de sus correspondientes insaturados y aparecen en géneros específicos (Gram positivos y negativos). Existen dudas acerca de su efecto en la fluidez de la membrana, no está confirmado que posean un efecto fluidificante (Cebrián, 2009).

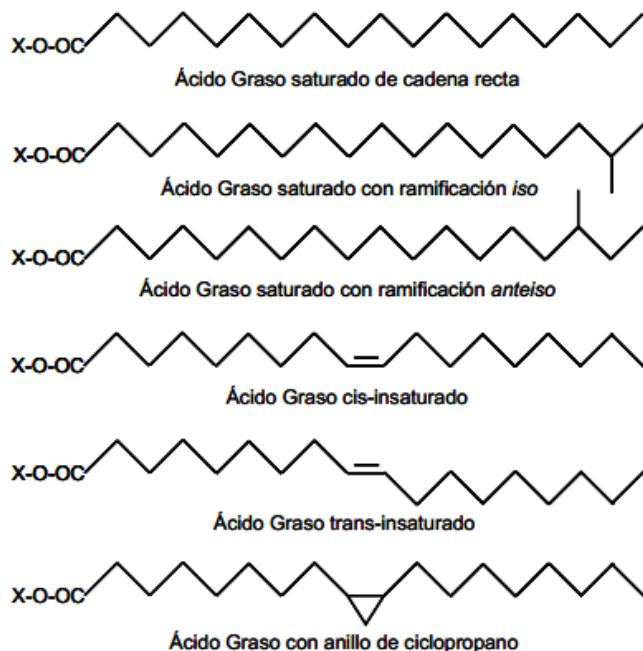


Figura 1.4. Estructura de los principales ácidos grasos presentes en la membrana citoplasmática de las células procariotas.

Finalmente, se debe tener en cuenta la longitud del ácido graso, de modo que los ácidos grasos de cadena corta poseen puntos de fusión inferiores a los de cadena larga, no son capaces de establecer interacciones hidrofóbicas con proteínas u otros ácidos grasos, y favorecen el movimiento de moléculas adyacentes porque dejan huecos libres en el interior de la bicapa (Denich et al., 2003).

Las bacterias Gram positivas, incluyendo *S. aureus*, contienen un gran porcentaje de ácidos grasos de cadena ramificada, más del 50% de los ácidos grasos son ramificados en los géneros *Bacillus*, *Micrococcus* y *Staphylococcus*. Sin embargo, poseen un bajo porcentaje de ácidos grasos insaturados (Denich et al., 2003).

Se ha demostrado que los cambios en la temperatura de crecimiento de los microorganismos dan lugar a cambios en la proporción de ácidos grasos de la membrana, lo que, a su vez podría conllevar cambios en la termorresistencia, puesto que las envolturas celulares son estructuras diana en el proceso de inactivación por calor (Mackey, 2000). De este modo, las células crecidas a temperaturas elevadas suelen presentar una mayor termorresistencia, lo que coincide con una menor fluidez, así como con una mayor proporción de ácidos grasos saturados y ácidos grasos con cadenas más largas, de efecto rigidificante, en sus membranas (Beuchat, 1978).

De todas maneras, se deben considerar asimismo otros componentes aparte de los ácidos grasos para determinar cómo varía la fluidez en función de la temperatura de crecimiento (Denich et al., 2003). Por ejemplo, algunos autores también han observado que durante el choque térmico, las células microbianas son capaces de rigidificar sus membranas debido a la interacción de algunas HSP con los lípidos de la membrana (Tourdot-Maréchal et al., 2000; Shigapova et al., 2005), habiendo propuesto que éste podría ser uno de los mecanismos mediante el cual las células incrementan su termorresistencia.

1.3. Antecedentes en *Staphylococcus aureus*.

S. aureus es un microorganismo Gram positivo, caracterizado por su ubicuidad. Es habitual su presencia en la piel y mucosas de los humanos, con lo cual se facilita la transmisión (Baird-Parker, 2000). La gran ubicuidad que posee viene dada por su capacidad de sobrevivir frente a numerosos estreses ambientales como la limitación de macro y/o micro nutrientes, variaciones en el pH y temperatura o la desecación (Cebrián, 2009).

Este microorganismo está considerado como patógeno oportunista para el ser humano, y responsable de varias infecciones e intoxicaciones; incluyendo intoxicaciones alimentarias, infecciones cutáneas superficiales, e incluso enfermedades más severas como neumonía, endocarditis, osteomielitis, meningitis, septicemia y/o sepsis (Lowy, 1998). Las intoxicaciones alimentarias causadas por *S. aureus* son debidas a la ingestión de enterotoxinas, producidas previamente por el microorganismo en el interior del alimento. Por el momento se conocen 16 enterotoxinas diferentes, de naturaleza proteica y con elevada resistencia al calor, congelación y digestión enzimática (Baird-Parker, 2000). Es una de las enfermedades alimentarias que presenta mayor número de comunicaciones y la principal causa microbiana de intoxicación alimentaria en Europa (EFSA, 2015).

Existen diversos antecedentes de estudios relacionados con la actividad del factor σ^B en *S. aureus*, como el de Giachino, Engelmann y Bischoff, publicado en el año 2001; o el de Senn et al, del año 2005. Estos artículos sugieren que el factor σ^B juega un importante papel en la respuesta de *S. aureus* a distintos estreses, como el calor, la radiación ultravioleta y el peróxido de hidrógeno, entre otros. La presencia de dicho factor conlleva la transcripción de genes concretos, que contribuyen a un aumento del desarrollo de la resistencia microbiana.

Asimismo, se han estudiado algunos mecanismos de inactivación y supervivencia de *S. aureus* a diversos procesos de conservación de alimentos, incluido entre ellos el calor. En el estudio realizado por Cebrián et al (2009) se ha comparado la termorresistencia de la cepa Newman con la de su mutante isogénico $\Delta sigB$, y la ausencia del factor σ^B supuso una gran disminución de la tolerancia al calor. El aumento de la termotolerancia en la cepa parental es atribuido a una mejor capacidad de las células para resistir y reparar los daños subletales provocados por el calor.

Finalmente, cabe destacar el estudio de Cebrián, Condón y Mañas (2018, aceptado para publicación), en el que se describe y caracteriza la influencia de la temperatura de crecimiento en la termorresistencia de células de *S. aureus* (cepa CECT 4459) en fase exponencial y estacionaria, así como el papel que ejerce la fluidez de la membrana en la supervivencia celular. Según los resultados obtenidos, la termorresistencia de *S. aureus* es dependiente de la temperatura y fase de crecimiento. De este modo, la resistencia al calor de las células en fase estacionaria de crecimiento aumentaba cuando las células estaban a una temperatura de incubación superior a 20 °C. Sin embargo, en el caso de las células en fase exponencial, sólo aquellas crecidas a 42 °C eran más resistentes al calor. Además, las células con membranas

más rígidas mostraron una mayor termorresistencia. Se demostró que existía una relación entre la fluidez de la membrana, la resistencia al calor y la capacidad de reparación de daños celulares subletales.

Tras el análisis de estos estudios, resulta razonable pensar que los cambios de expresión del factor σ^B de fase estacionaria, de manera simultánea a los cambios en el perfil proteico celular total, podrían producir cambios específicos en la membrana, que a su vez en su conjunto se tradujesen en una mayor resistencia microbiana a los tratamientos tecnológicos, y más en concreto, a los tratamientos térmicos.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

A pesar de la relevancia sanitaria de *S. aureus*, se desconoce en gran medida la influencia de diversos factores en la susceptibilidad de este microorganismo a los tratamientos térmicos. Además, su resistencia frente a las tecnologías de conservación de los alimentos ha sido mucho menos estudiada que la de otros patógenos alimentarios.

Se ha demostrado que la membrana citoplasmática de los microorganismos es una de las estructuras diana en los tratamientos térmicos, y por ello se ha sugerido que su composición, estado y fluidez podrían influir en la termorresistencia. Existen varias evidencias de la posible relación entre la fluidez y resistencia microbiana, sin embargo, todavía no se conoce con precisión la forma en la que las células microbianas regulan su fluidez y termorresistencia en función de la temperatura de crecimiento.

Es realmente necesario investigar más en profundidad todos estos aspectos, puesto que la mejora de la eficacia de los métodos que se utilizan actualmente en la industria alimentaria para la inactivación microbiana, así como el diseño de procesos más efectivos, depende en gran parte de los conocimientos adquiridos.

El objetivo general de este Trabajo de Fin de Grado fue estudiar el papel que el factor σ^B de resistencia general tiene en el desarrollo de termorresistencia que experimenta *S. aureus*, y si este fenómeno está relacionado de alguna forma con cambios en la composición de la membrana citoplasmática.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

-Determinar la evolución de la termorresistencia de *S. aureus* a lo largo del tiempo de incubación a temperatura constante.

-Estudiar la influencia de la temperatura de incubación en la termorresistencia de *S. aureus*.

-Estudiar la influencia del tiempo y temperatura de incubación en la composición de los ácidos grasos de la membrana citoplasmática de *S. aureus*.

-Analizar la posible relación entre termorresistencia y composición de la membrana citoplasmática.

3. METODOLOGÍA

3.1. Microorganismo.

Para llevar a cabo este estudio, se utilizó la cepa de *S. aureus* denominada Newman, proporcionada por Brigitte Berger-Bächi, del Instituto de Microbiología Médica de la Universidad de Zurich. Esta es una cepa que se ha demostrado que expresa el factor σ^B y que se ha utilizado frecuentemente en estudios acerca de dicho factor de resistencia. Dicha cepa se conservó en un criovial a -80 °C.

3.2. Medios de cultivo y de tratamiento.

El agar tripticasa-soja (TSA) y el caldo tripticasa-soja (TSB) fueron suministrados por la firma Biolife (Milán, Italia), y se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante. Ambos medios se suplementaron con 0,6 % p/v de extracto de levadura (EL, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). El agua de peptona no tamponada fue suministrada por la marca Oxoid, y asimismo, fue preparada siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante. Todos estos medios, una vez preparados, se esterilizaron durante 20 minutos a 121 °C en un autoclave (modelo Presoclave III 80, Selecta, Abrera, Barcelona, España) y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso.

Como medio de tratamiento para los estudios de resistencia al calor, se utilizó tampón McIlvaine de pH 7,0. Para su elaboración se empleó fosfato disódico anhidro y ácido cítrico 1-hidrato (Panreac S.A., Barcelona, España), según describen Dawson et al (1974). El pH se midió, por si fuera necesario su ajuste, mediante un pHmetro (modelo Basic 20, Crison Instruments S.A., Alella, Barcelona, España).

3.3. Suspensiones de trabajo.

A partir del criovial en congelación, se sembraron placas de TSA-EL por agotamiento en estría que se incubaron en una estufa estática (modelo Incubig, Selecta, Abrera, Barcelona, España) durante 24 horas a 37 °C (± 1 °C). Partiendo de una colonia aislada de dichas placas, se sembraron frascos que contenían 10 ml de TSB-EL estéril y se incubaron (estufa de aire forzado, Selecta, Abrera, Barcelona, España) durante 12 horas a 37 °C (± 1 °C) en agitación (agitador modelo Vibramax 100, Heidolph Instruments GMBH & Co. KG, Schwabach, Alemania).

Tras determinar la concentración celular de este precultivo mediante recuento microscópico (Nikon, Eclipse E-400, Japón) en cámara de Thoma, se inocularon frascos con 50 ml de TSB-

EL esterilizado y estabilizado a la temperatura de incubación seleccionada, con una concentración inicial de 10^6 microorganismos/ml. Una vez sembrados los frascos, se incubaron en agitación a las temperaturas de 20, 30, 37 y 42°C (± 1 °C), durante el periodo de tiempo requerido para realizar las determinaciones.

3.4. Curvas de crecimiento.

Para elaborar las curvas de crecimiento se extraía, a intervalos predeterminados de tiempo (cada 2 horas y a 20 °C cada 4 horas), 1 ml de muestra de los frascos de 50 ml de TSB-EL en incubación. Tras realizar las correspondientes diluciones decimales en agua de peptona, se sembraban placas de TSA-EL por homogeneización en masa, que se incubaban durante 24 horas a 37 °C (± 1 °C). El número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) se estimaba a partir de la media de los recuentos obtenidos en las placas correspondientes a cada dilución, de al menos dos diluciones decimales consecutivas. Las curvas de crecimiento se elaboraron representando el logaritmo del número de UFC/ml frente al tiempo de incubación.

3.5. Preparación de las muestras para inoculación en el termorresistómetro.

Antes de inocular las suspensiones microbianas en el termorresistómetro, y con el objetivo de homogeneizar las concentraciones iniciales en las curvas de supervivencia, se realizaban unos pequeños ajustes en las mismas, según la concentración microbiana presente en los cultivos. De modo que, si la concentración de la suspensión era de aproximadamente 1×10^6 UFC/ml, se vertían 10 ml de la suspensión en un tubo estéril, posteriormente se distribuían en eppendorfs (1ml a cada eppendorf) y se llevaba a cabo una etapa de concentración celular en una microcentrífuga (modelo Minispin Plus, Eppendorf, Madrid, España) durante 90 segundos a 10.000 rpm. Tras la centrifugación, se desechaba el sobrenadante. Los depósitos o pellets obtenidos se conservaban, mezclaban y homogeneizaban, hasta conseguir un volumen de unos 0,3-0,4 ml.

En el caso de que la concentración microbiana alcanzara en los cultivos el valor de 1×10^7 UFC/ml, se procedía de idéntica manera a lo comentado anteriormente, salvo que tras conseguir el volumen de células concentradas de 0,3-0,4 ml, la muestra se diluía con agua de peptona hasta llegar a 1 ml de volumen. Para concentraciones en el rango de 1×10^8 UFC/ml, el inóculo se obtenía directamente del cultivo original, sin ser necesario realizar ajustes y, finalmente, si las concentraciones alcanzaban valores similares a 1×10^9 UFC/ml, se diluía 10 veces la muestra de cultivo antes de proceder a la inoculación.

3.6. Determinaciones de resistencia al calor.

Las determinaciones de resistencia al calor se realizaron en el termorresistómetro TR-SC (Condón et al., 1993). La Figura 3.1 muestra un esquema de las partes mecánica (A) y electrónica (B) del termorresistómetro empleado, así como una imagen real del equipo. El termorresistómetro TR-SC consta de un vaso de tratamiento de acero inoxidable de 400 ml de capacidad (1) cerrado por la parte superior con una tapa enroscable de acero inoxidable (2). En la tapa existen orificios por los que se incorpora la resistencia eléctrica para el calentamiento del medio de tratamiento (3), un sistema de enfriamiento por recirculación de agua fría (4), un sistema de agitación para una rápida homogenización de la temperatura y del inóculo en el medio de tratamiento (5), un deflector para mejorar la turbulencia dentro del vaso y evitar un flujo centrífugo predominante (6), una sonda termopar para el control de la temperatura de tratamiento (7) y un presostato para regular la presurización del medio con N₂ de alimentación (8). El inóculo microbiano se inyecta por un orificio de inyección cerrado con un septum de cromatografía (9) y la toma de muestras se realiza a través de un tubo de extracción cerrado con una válvula solenoide (10). El circuito electrónico (B) está conectado, por un lado, a la resistencia eléctrica (3), el sistema de enfriamiento (4) y la sonda termopar (7) para proporcionar una temperatura constante a lo largo del tratamiento y, por otro lado, a la válvula solenoide (10) para regular su apertura y permitir la recogida de muestras.

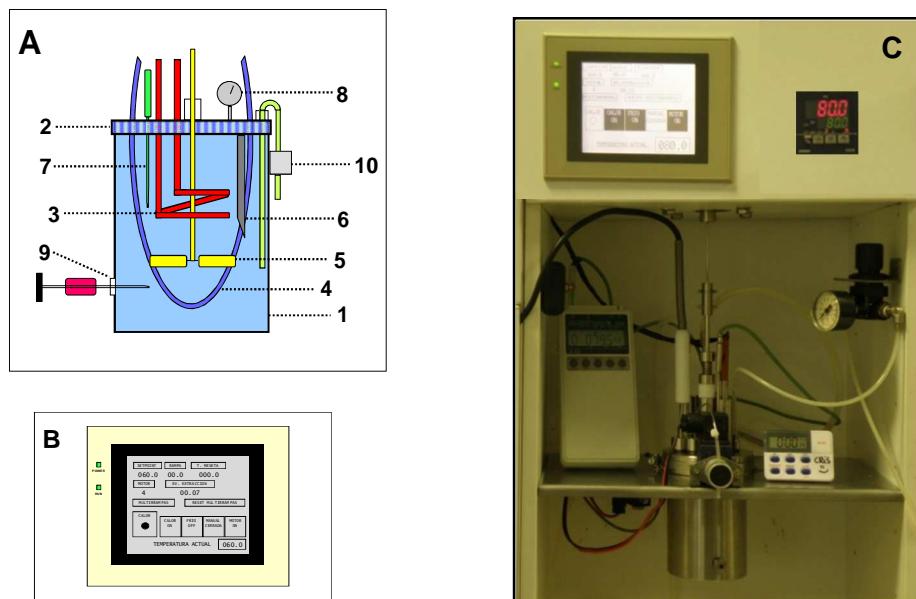


Figura 3.1. Esquema de las partes mecánica (A) y electrónica (B) del Termorresistómetro TR-SC e imagen real del equipo (C) (Adaptado de Cebrián, 2009).

Antes y después de cada sesión de trabajo se esterilizaban (20 minutos; 120 °C) tanto el equipo como el medio de tratamiento (McIlvaine). Una vez el medio (350-400 ml) se encontraba estabilizado a la temperatura de tratamiento (54 °C), se inyectaban 0,2 ml de la suspensión microbiana (ya ajustada según lo indicado en el anterior apartado) en la cámara de tratamiento mediante una jeringuilla previamente desinfectada (CR-700-200 Hamilton Co., Reno, Nevada, EE. UU.). Durante el tratamiento y a intervalos predeterminados de tiempo, se extraían muestras de 0,25 ml directamente en placas de Petri estériles, a las que inmediatamente se añadía el medio de recuperación estéril, fundido y atemperado a 45 °C. Las placas se homogeneizaban y posteriormente se incubaban a 37 °C (± 1 °C) durante 24 horas para su posterior recuento.

3.7. Incubación y recuento de supervivientes.

En las determinaciones de termorresistencia, el recuento de supervivientes se realizó en TSA-EL. Las placas se incubaban a 37°C (± 1 °C) en estufa estática durante 24 horas, hasta que el número de colonias recuperadas se mantenía constante. El recuento de supervivientes se efectuó mediante un contador automático de colonias por análisis de imagen. Se optó por utilizar el rango de recuento comprendido entre 30 y 50.000 UFC/placa.

3.8. Elaboración de gráficas de supervivencia y modelización de las mismas.

Una vez obtenidos los recuentos, se elaboraron las gráficas de supervivencia mediante Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Co., Redmond, Washington, U.S.A). Se representó el logaritmo de la fracción de supervivientes (N_t/N_0) frente al tiempo de tratamiento. Dado que las células alcanzaron instantáneamente la temperatura de tratamiento, el número inicial (N_0) se correspondió con el número de células inoculadas.

Posteriormente, los datos experimentales fueron modelizados con la herramienta GIaFiT (KU Leuven, Leuven, Bélgica) de Microsoft Office Excel 2010. Las curvas de supervivencia obtenidas en este trabajo, presentaban en su mayoría un perfil recto, por lo que se empleó para llevar a cabo la modelización, el modelo log. lineal de Bigelow y Esty (1920). Dicho modelo describe las curvas de supervivencia a través de la tasa de inactivación (K_{max}), que se define como la pendiente de la parte exponencial de la curva de supervivencia (min^{-1}). La ecuación que define el modelo es la Ecuación 3.1.

$$N(t) = N(0) \cdot e^{-k_{max} \cdot t} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

Dónde:

- N (UFC/ml) representa la concentración final de células.
- $N(0)$ (UFC/ml) es la concentración inicial de células.
- k_{max} es la velocidad específica de inactivación (1/unidad de tiempo).
- t es el tiempo (unidad de tiempo).

En caso de observarse fenómenos de hombro, se empleó el modelo log. lineal- hombro de Geeraerd et al (2000). Ese modelo describe las curvas de supervivencia a través de dos parámetros: la longitud del hombro (S_l), definido como la dosis o tiempo antes de que comience la inactivación exponencial, que en este caso se expresaba en minutos; y la tasa de inactivación (K_{max}). La ecuación que define este modelo es la Ecuación 3.2.

$$N(t) = N(0) \cdot e^{-k_{max} \cdot t} \cdot \left[\frac{e^{k_{max} \cdot S_l}}{1 + (e^{k_{max} \cdot S_{l-1}}) \cdot e^{-k_{max} \cdot t}} \right] \quad \text{Ecuación 3.2}$$

Dónde:

- N (UFC/ml) representa la concentración final de células.
- $N(0)$ (UFC/ml) es la concentración inicial de células.
- k_{max} es la velocidad específica de inactivación (1/unidad de tiempo).
- S_l es el parámetro que representa el hombro (unidades de tiempo).
- t es el tiempo (unidad de tiempo).

3.9. Cálculo de los parámetros de resistencia y análisis estadístico.

Se calcularon los tiempos de reducción decimal (D_t , en minutos) a partir de la inversa de la pendiente de la regresión lineal (ver Ecuación 3.3.) en las gráficas que siguieron una cinética de primer orden, o a través la Ecuación 3.2, en aquellas curvas modelizadas con la ecuación de Geeraerd.

$$D_t = \frac{k_{max}}{2,303} \quad \text{Ecuación 3.3}$$

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico utilizando el programa GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, EE. UU.) A través de dicho programa, se realizaron los test t de Student y los Análisis de Varianza (ANOVA) correspondientes. Este mismo programa se utilizó para elaborar las representaciones gráficas que se incluyen en esta memoria.

3.10. Preparación de las muestras para el análisis de ácidos grasos.

Este análisis se llevó a cabo en el servicio disponible en la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo), para lo cual fue necesario preparar y enviar las células de *S. aureus*. Se obtuvieron cultivos en fase exponencial y en fase estacionaria, a todas las temperaturas de incubación (20, 30, 37 y 42 °C). Para obtener las suspensiones de células en fase exponencial de crecimiento, la incubación se interrumpía cuando se alcanzaba un valor de absorbancia de 0,800 a 600 nm, que correspondía a una concentración aproximada de 1×10^8 UFC/ml. Las absorbancias se medían en un espectrofotómetro (modelo Libra S12, Biochrom, Cambridge, Reino Unido). Para poder llevar a cabo este procedimiento, se realizó un trabajo previo con el objetivo de establecer la relación entre la absorbancia y la concentración de microorganismos. Así, a lo largo de la curva de crecimiento de varias suspensiones microbianas, y en períodos establecidos de tiempo, se fue monitorizando la absorbancia que presentaban, el recuento microscópico y el recuento en placa (datos no mostrados).

Por otro lado, para obtener suspensiones en fase estacionaria, la incubación se prolongaba durante 24 horas (para las incubaciones a 30 y 37 °C), durante 12 horas (para la incubación a 42 °C) y en el caso de la incubación a 20 °C, durante 48 h.

Una vez obtenidos los cultivos, se vertían 50 ml de las suspensiones microbianas en tubos Falcon y se introducían en la centrífuga (modelo 1736R, Gyfrozen CO., Korea) durante 10 minutos a 3.000 rpm. Tras la centrifugación, se desechaba la mayoría del sobrenadante y se procedía a resuspender los pellets con una pequeña cantidad de líquido del cultivo. Una vez resuspendidos, se pasaban 5 ml a tubos de vidrio estériles y se llevaba a cabo una segunda etapa de centrifugación. Finalmente, se retiraba el total del sobrenadante tras la centrifugación y se conservaban los tubos con las muestras en congelación a -80 °C hasta su expedición a la CECT.

Para realizar el análisis de ácidos grasos, la CECT utiliza un sistema de identificación microbiana (MIDI Inc.'s Sherlock® Microbial Identification System). De manera resumida, las muestras preparadas con anterioridad sufrieron una saponificación, y posteriormente una metilación. Se obtuvieron de este modo los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs). Los FAMEs son más volátiles que sus respectivos ácidos grasos y por tanto, más apropiados para el análisis por cromatografía de gases. Dichos FAMEs se extrajeron de la fase acuosa a la orgánica, y finalmente, se lavó el extracto orgánico con medio acuoso, como fase previa al análisis cromatográfico.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Curvas de crecimiento de *S. aureus* Newman a diferentes temperaturas.

Con objeto de estudiar la influencia de la temperatura y tiempo de crecimiento en la resistencia al calor de *S. aureus* Newman, se obtuvieron, en primer lugar, las curvas de crecimiento a las diferentes temperaturas, que representan el logaritmo del recuento microbiano ($\text{Log } N_t$) frente al tiempo de incubación en horas. La Figura 4.1 muestra las curvas de crecimiento de *S. aureus* a las 4 temperaturas estudiadas.

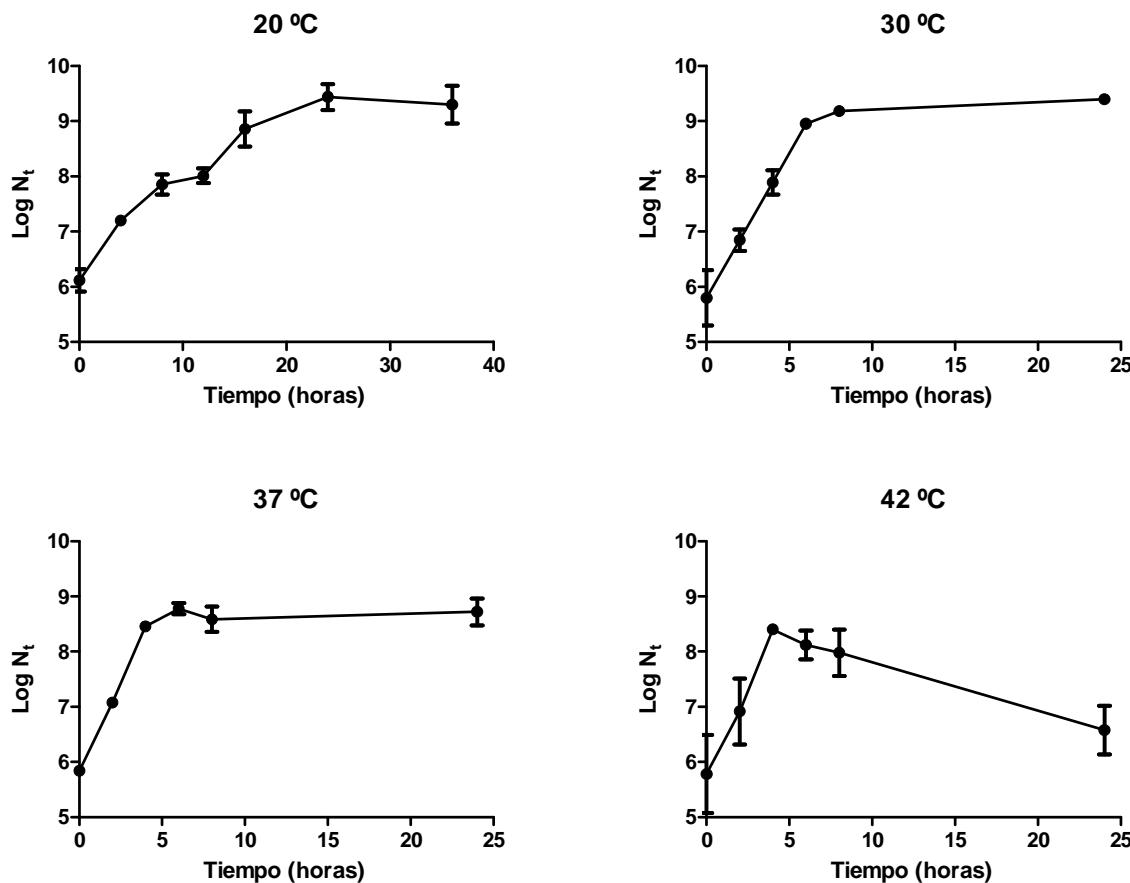


Figura 4.1. Curvas de crecimiento de *S. aureus* Newman a 20 °C, 30 °C, 37 °C y 42 °C.

Como se puede deducir de la figura, menores temperaturas de incubación resultaron en velocidades de crecimiento más lentas. Así, el crecimiento de *S. aureus* a 20 °C fue notablemente más lento, necesitando las células al menos 16 horas de incubación para alcanzar la fase estacionaria. Aunque las gráficas de crecimiento a 30 y 37 °C fueron similares, a 37 °C los cultivos ya habían alcanzado su máxima concentración a las 6 horas (y por lo tanto se encontrarían ya en fase estacionaria), mientras que fueron necesarias al menos 8 horas para que las células crecidas a 30 °C alcanzaran dicha fase. Finalmente, cabe destacar

que aunque las células crecidas a 42 °C mostraron una velocidad de crecimiento similar a las de 37 °C, se observan dos diferencias notables en este cultivo en relación al resto de temperaturas de incubación empleadas. Por una parte, la concentración celular que alcanzaron fue inferior al resto de temperaturas y por otra parte se observa que, inmediatamente tras alcanzarla, entraron en una fase de muerte celular.

La temperatura óptima de crecimiento para la mayoría de cepas de *S. aureus* se encuentra entre 35 y 40 °C (Baird-Parker, 2000), por lo que los resultados obtenidos se corresponden con lo esperado. Por otra parte, y en relación a los resultados obtenidos a 42 °C, podrían ser atribuidos al hecho de que esta es una temperatura límite de crecimiento. Resultados similares han sido observados por diversos autores, como Van Derlinden, Bernaerts e Impe (2008).

4.2. Influencia del tiempo y la temperatura de incubación en la termorresistencia de *S. aureus* Newman.

Para estudiar la influencia del tiempo y la temperatura de incubación en la termorresistencia de *S. aureus* Newman, se obtuvieron las gráficas de supervivencia de suspensiones de diferente edad (tiempo de incubación) para cada una de las temperaturas de crecimiento investigadas (20, 30, 37 y 42 °C). Las gráficas de supervivencia al calor de las diferentes suspensiones microbianas se obtuvieron tras representar el logaritmo de la fracción de supervivientes (N/N_0) frente al tiempo de tratamiento (en minutos). Dichas gráficas se modelizaron, tal como se describe en el apartado de metodología, con la herramienta GIaNaFiT. Se ha escogido un ejemplo representativo, es decir, una sola suspensión, para ilustrar lo ocurrido a cada temperatura de incubación (Figura 4.2.). El resto de réplicas presentaron un comportamiento similar al mostrado en la figura.

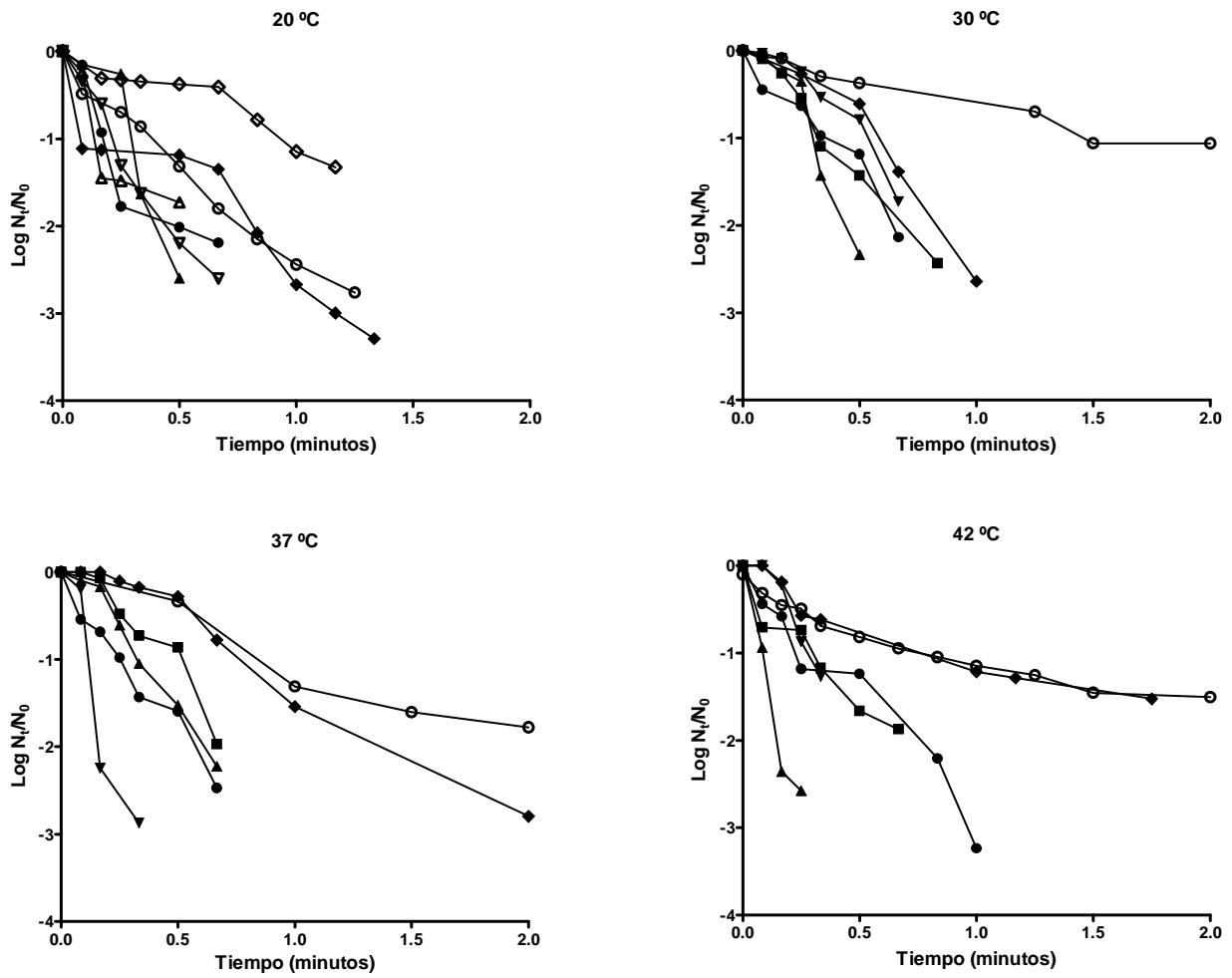


Figura 4.2. Gráficas de supervivencia a 54 °C de las suspensiones de *S. aureus* Newman incubadas durante 0 horas (●), 2 horas (■), 4 horas (▲), 6 horas (▼), 8 horas (◆), 12 horas (△), 16 horas (▽), 24 horas (○) y 36 horas (◇), y obtenidas a 20 °C, 30 °C, 37 °C y 42 °C.

Dado que en la mayoría de los casos las curvas de supervivencia presentaron un perfil lineal, se empleó para su modelización el modelo log. lineal de Bigelow y Esty (1920). En el caso de la herramienta GIaFiT, este modelo describe las curvas de supervivencia a través de la tasa de inactivación (K_{max}), que se define como la pendiente de la parte exponencial de la curva de supervivencia (min^{-1}). El valor D tradicional se puede calcular a partir de la misma según se describe en el apartado de metodología. No obstante, y como puede observarse en la Figura 4.2, en algunos casos las curvas de supervivencia obtenidas presentaron desviaciones de la linealidad, en forma de “hombros”. En caso de observarse fenómenos de hombro, se empleó el modelo log. lineal-hombro de Geeraerd et al (2000). Ese modelo describe las curvas de supervivencia a través de dos parámetros: la longitud del hombro (SI), definido como la dosis o tiempo antes de que comience la inactivación exponencial, que en este caso se expresaba en minutos; y la tasa de inactivación (K_{max}).

La presencia de hombros en gráficas de supervivencia al calor de células vegetativas ha sido atribuida a diferentes fenómenos, como la formación de agregados celulares y la capacidad de las células de tolerar o reparar daños subletales (Cebrián, Condón y Mañas, 2017). La presencia de agregados celulares conlleva la aparición de hombros, ya que no se aprecian disminuciones en los recuentos microbianos hasta que todas las células que conforman cada agregado son inactivadas. Por otro lado, los daños subletales también motivan la aparición de fenómenos de hombro, puesto que hasta que no se alcanza un objetivo letal o la cantidad de daños subletales supera un umbral concreto, las células mantienen la capacidad de reparar sus lesiones y formar colonias, si las condiciones de recuperación son adecuadas (Mackey, 2000). En el caso particular de *S. aureus*, en el estudio de Cebrián, Condón y Mañas (2018), se demuestra que en la mayoría de las ocasiones su aparición está relacionada con la agregación celular. Además, es necesario señalar que en este estudio, cuando aparecieron hombros, su magnitud fue siempre reducida. De todas maneras, para poder calcular con más precisión el valor D_t , se utilizó el modelo de Geeraerd para la modelización de las curvas de inactivación.

A pesar de que en algún caso las curvas de supervivencia sugieren la existencia de colas, un fenómeno que generalmente es debido a la existencia de una distribución de termotolerancias en la población bacteriana y/o a la presencia de fenómenos microbianos de adaptación (Cebrián, Condón y Mañas, 2017), la propia herramienta empleada para modelizar (GInaFiT), estimaba que dicho fenómeno no era suficientemente significativo, lo que en la práctica es equivalente a decir que realmente no existían.

Como puede observarse en la Figura 4.2, para todas las temperaturas de crecimiento, un incremento en el tiempo de incubación condujo a un incremento en la termorresistencia de *S. aureus*. No obstante, las gráficas presentadas en la figura indican que, por ejemplo, para las células crecidas a 37 °C, las gráficas de supervivencia se pueden agrupar en dos grupos. Por un lado, los microorganismos crecidos durante 0, 2, 4 y 6 horas, que mostraron una termorresistencia similar y poco elevada. Por otro lado, las suspensiones incubadas durante 8 y 24 horas, en las que se observó un aumento notable en la tolerancia al calor de las células. Resultados similares se observaron para el resto de temperaturas de cultivo, aunque se debe tener en cuenta que entre las suspensiones incubadas durante 8 horas el comportamiento fue algo variable, debido a pequeñas diferencias en los momentos de entrada de las células en fase estacionaria.

Para ilustrar con mayor detalle la influencia que ejerce el tiempo de incubación en la termorresistencia de *S. aureus*, se elaboraron gráficas para cada temperatura de crecimiento, donde se muestra la evolución del valor D_t con el tiempo de incubación de los microorganismos (Figura 4.3.). Las gráficas incluyen también la curva de crecimiento a efectos comparativos.

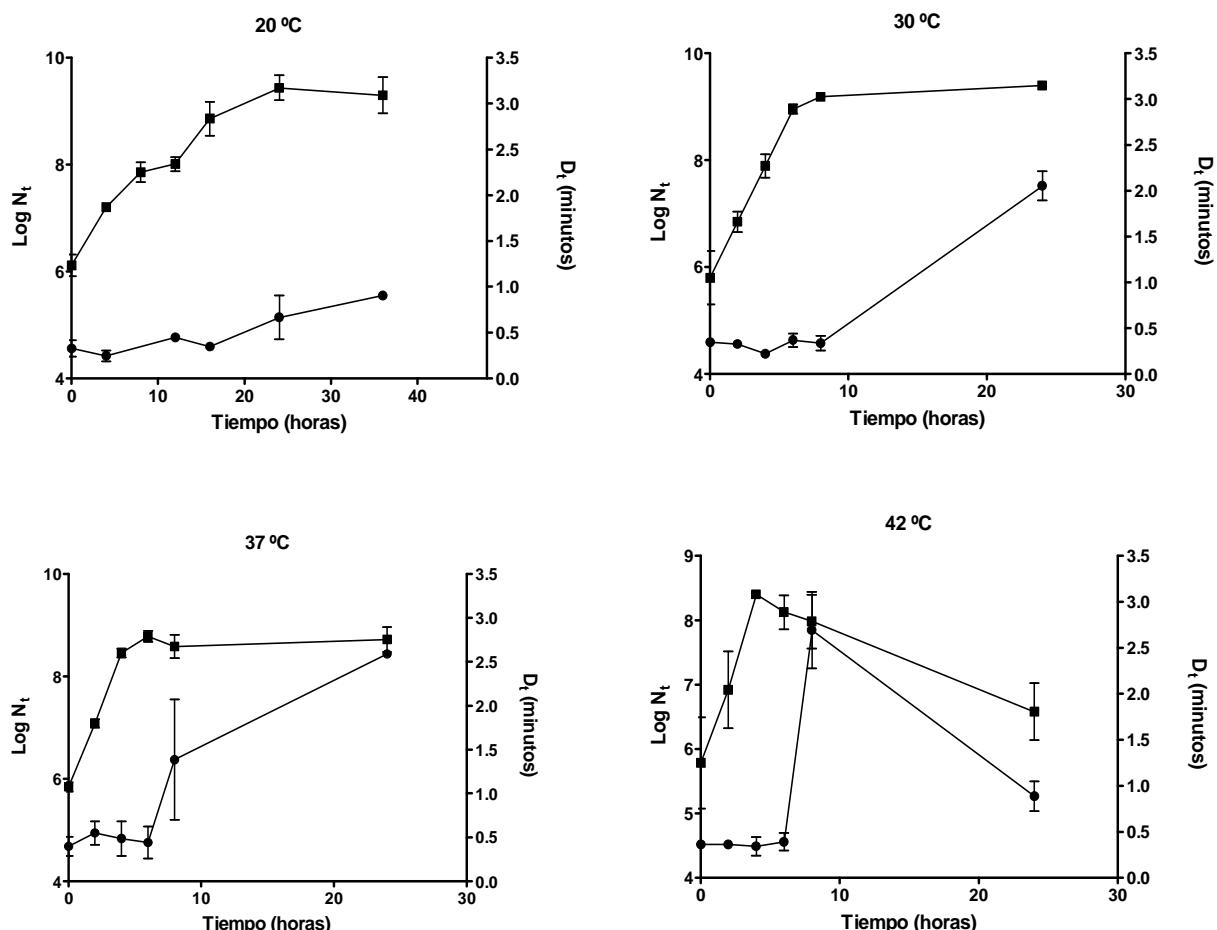


Figura 4.3. Influencia del tiempo de incubación en la termorresistencia de *S. aureus* Newman, a 20 °C, 30 °C, 37 °C y 42 °C de incubación, representándose el parámetro D_{54} (●) y Log N₀ (■).

A las temperaturas de 20 y 30 °C de incubación, se puede observar que justo al realizarse el cambio de las células de fase exponencial a estacionaria de crecimiento, el valor D_{54} aumentaba considerablemente, por lo tanto, se demuestra que las células en fase estacionaria eran más termorresistentes. Las células incubadas a 37 °C, según se observa en la gráfica, entrarían en fase estacionaria a las 6 horas y sin embargo, el incremento de la termorresistencia se aprecia a las 8 horas, y con mayor variabilidad en ese punto concreto. Esto puede ser debido a que en esos momentos cercanos a la transición a fase estacionaria, existe heterogeneidad en la población, de manera que algunas células se encuentren en fase

exponencial, y otras en fase estacionaria. En el caso de las células crecidas a 42 °C, también se observa que se produjo un brusco aumento del valor D_{54} , inmediatamente después de la entrada en fase estacionaria de las células, pero al contrario que para las otras temperaturas estudiadas, a continuación se observó una rápida caída de este parámetro, que ocurrió paralelamente a la disminución del número de microorganismos viables presentes en el cultivo.

Finalmente, con el objetivo de poder comparar simultáneamente el efecto que ejercen tanto el tiempo como la fase de crecimiento, se elaboró una gráfica (Figura 4.4.) en la que se representan los valores promedio del parámetro D_{54} , para las células en fase exponencial y estacionaria de crecimiento, para cada temperatura de crecimiento.

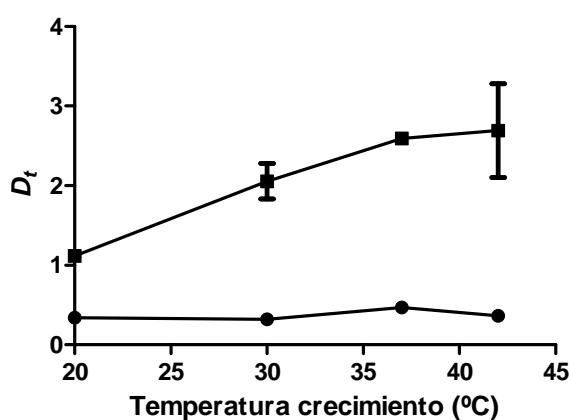


Figura 4.4. Evolución del parámetro D_5 con la temperatura de cultivo, en las células de *S. aureus* Newman en fase exponencial (●) y fase estacionaria (■).

En dicha figura se puede apreciar, por una parte, que las células en fase estacionaria poseían un D_{54} mayor en comparación a las de fase exponencial, para todas las temperaturas de crecimiento estudiadas. Por otra parte, la figura demuestra la importante influencia que ejerce la temperatura de incubación en la termorresistencia de *S. aureus*, ya que conforme aumentaba la primera, aumentaba la termotolerancia de los microorganismos. No obstante, la magnitud de este efecto no fue igual para células en fase exponencial y estacionaria de crecimiento. Así, en el caso de las células en fase exponencial no se observaron apenas diferencias en resistencia y tan sólo fueron significativamente ($p<0,05$) más termorresistentes las crecidas a 37 °C. Sin embargo, este incremento de termorresistencia fue de baja magnitud, siendo su D_{54} sólo 1,4 veces mayor que el del resto de células.

Por el contrario, en el caso de las células en fase estacionaria, se observaron diferencias significativas ($p<0,05$) en termorresistencia entre las crecidas a 20 °C, y el resto, que mostraron un valor D_{54} hasta 2,2 veces más elevado, y por tanto una mayor tolerancia al calor. La termorresistencia de las células crecidas a 30, 37 y 42 °C fue muy similar (no existieron diferencias significativas; $p>0,05$), aunque sí se observó una ligera tendencia creciente conforme aumentaba la temperatura de incubación.

En relación a la influencia de la temperatura de incubación en la resistencia de los microorganismos al calor, se suele asumir que las células crecidas a temperaturas más elevadas presentan una mayor termorresistencia. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la mayoría de estudios se han llevado a cabo con células exclusivamente en fase estacionaria. De este modo, también se ha demostrado que la termorresistencia puede depender del rango de temperaturas empleado y del estado fisiológico de las células (Cebrián, Condón y Mañas, 2018). La explicación más generalizada del efecto que ejerce la temperatura de crecimiento en la termorresistencia de las células vegetativas es que este fenómeno está relacionado con la modificación de la composición en ácidos grasos y proteínas de la membrana, aspecto que se estudiará con más detalle en el apartado 4.3 de esta memoria.

Por otro lado, los resultados obtenidos en este estudio en relación a la influencia de la fase de crecimiento en la termorresistencia, concuerdan con lo descrito en otras ocasiones, esto es, que las células en fase exponencial de crecimiento son más sensibles al calor que las células en fase estacionaria (Smelt y Brul, 2014; Cebrián, Condón y Mañas, 2017). Este hecho se explicaría por el aumento de la expresión del factor σ de fase estacionaria σ^B durante la entrada en la fase estacionaria, que controla la transcripción de genes involucrados en la resistencia a varios estreses, incluyendo el calor (Giachino, Engelmann y Bischoff, 2001; Senn et al., 2005; Cebrián, Condón y Mañas, 2017). En las células en fase exponencial este factor no se expresa, o lo hace de una forma muy reducida, (Chan et al., 1998; Giachino, Engelmann y Bischoff, 2001; Senn et al., 2005) razón por la cual no se observan apenas diferencias en termorresistencia.

Además, los resultados obtenidos concuerdan, al menos en parte, con aquellos que se muestran en el estudio de Cebrián, Condón y Mañas (2018). En dicho estudio se describe que la resistencia al calor de las células de *S. aureus* en fase exponencial no variaba en el rango de temperaturas comprendido entre 10 y 37 °C. No obstante, en el trabajo de Cebrián, Condón y Mañas (2018), se describe que las células en fase exponencial crecidas a 42 °C eran

significativamente más termorresistentes, mostrando valores D_{58} 2,5 veces mayores, algo que no se observó en este estudio. Estas pequeñas diferencias podrían ser atribuidas a las diferentes cepas utilizadas, que podrían presentar mecanismos de regulación del desarrollo de termorresistencia ligeramente diferentes. De hecho, los valores D_t de la cepa CECT 4459 (utilizada en el estudio de Cebrián, Condón y Mañas, 2018) para células en fase estacionaria de crecimiento son superiores a los de la cepa Newman (utilizada en este estudio), lo que sugiere que la capacidad de desarrollo de termorresistencia sería mayor en el caso de la primera. Por otro lado, la resistencia al calor de las células en fase estacionaria de crecimiento también aumentaba cuando las células estaban a una temperatura de incubación superior a 20 °C.

Todos estos resultados, analizados en conjunto, indican que, muy probablemente, la expresión del factor σ^B sería necesaria para que las células de *S. aureus* cultivadas a mayores temperaturas sean capaces de desarrollar una termorresistencia más elevada. Asimismo, sugieren que dicha actividad sería mayor cuanto más elevada fuese la temperatura de crecimiento (lo que se traduciría en una mayor termorresistencia en fase estacionaria), aunque sería necesario llevar a cabo nuevos estudios para verificar estos aspectos.

4.3. Composición en ácidos grasos de la membrana de *S. aureus* Newman y relación con la termorresistencia.

Los microorganismos regulan su composición en ácidos grasos de la membrana citoplasmática como respuesta para contrarrestar los cambios en su fluidez que se producen por las variaciones de temperatura exterior. La presencia de ácidos grasos insaturados y ramificados favorece la fluidificación de la membrana citoplasmática. Sin embargo, los ácidos grasos saturados aportan una mayor rigidez. De este modo, cuando la temperatura de incubación es mayor, es frecuente observar un incremento en la proporción de ácidos grasos saturados y de cadena larga. Por el contrario, los ácidos grasos de cadena corta, ramificados, e insaturados se incrementan a temperaturas más bajas, ya que dichas temperaturas actúan solidificando la membrana (Denich et al., 2003). De forma paralela, se ha sugerido que aquellas membranas con mayor concentración de ácidos grasos saturados (más rígidas) deberían ser más resistentes frente a la acción del calor (Beuchat, 1978), y por ello, en este Trabajo Fin de Grado se abordó el estudio de la influencia de la temperatura y tiempo de crecimiento en la composición de ácidos grasos de membrana de las células de *S. aureus*.

Para poder llevar a cabo el análisis de composición de ácidos grasos en la CECT, fue necesario preparar las células de *S. aureus*, tal como se describe en el apartado de metodología, a partir de cultivos en fase exponencial y estacionaria, a todas las temperaturas de incubación (20, 30, 37 y 42 °C). Los resultados obtenidos tras la realización del análisis se muestran en la Tabla 1 del Anexo.

El ácido graso mayoritario, tanto en las células que se encontraban en fase exponencial como en estacionaria, y a todas las temperaturas de incubación resultó ser el 15:0 anteiso, algo que concuerda con los resultados obtenidos previamente por otros autores (Beck, 2005). En cuanto a su evolución (Figura 4.5.), se puede destacar que en las células en fase estacionaria, al aumentar la temperatura de cultivo, fue disminuyendo progresivamente su proporción, desde el 50% que representaba a 20 °C hasta un 30% a 42 °C. Las células en fase exponencial de crecimiento poseían una menor proporción de este ácido graso (rango entre 37 y 27%), que también fue disminuyendo conforme aumentaba la temperatura. En todos los casos fue el ácido graso mayoritario con diferencia. Los siguientes ácidos grasos iban variando según la suspensión microbiana estudiada.

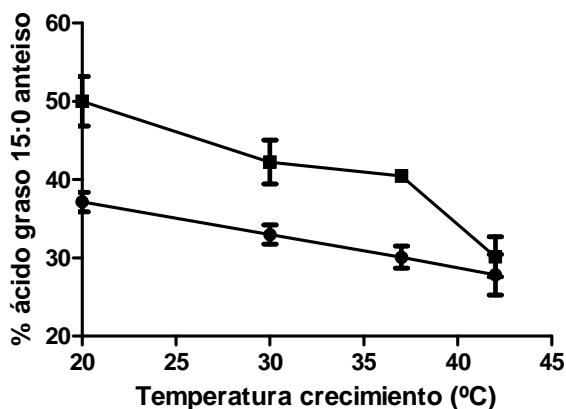


Figura 4.5. Evolución del porcentaje que representa el ácido graso 15:0 anteiso en la membrana citoplasmática de *S. aureus* Newman en función de la temperatura de crecimiento, en las células en fase exponencial (●) y estacionaria (■).

Dada la complejidad de establecer una comparación para cada uno de los ácidos grasos determinados y todas las condiciones de crecimiento estudiadas (no sólo desde el punto de vista estadístico, sino también del de su interpretación) se optó por buscar un índice que reflejara los cambios globales en la composición de ácidos grasos de las membranas de las células de *S. aureus*. Uno de los índices más empleados para cuantificar la fluidez de una grasa es el cálculo de la proporción de ácidos grasos insaturados frente a la de saturados, de

tal forma que cuanto mayor sea este índice, mayor es la fluidez (Denich et al., 2003). De forma análoga, este índice se puede utilizar para las membranas citoplasmáticas de los microorganismos, pero, dada su especial composición, se suele optar por calcular la proporción de ácidos grasos insaturados más ramificados frente a la de ácidos grasos saturados. Este es el índice que se ha escogido a la hora de elaborar la Figura 4.6.

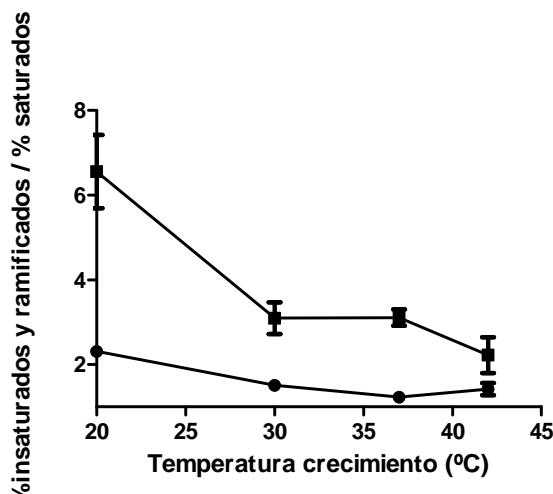


Figura 4.6. Evolución del índice de fluidez (% ácidos grasos insaturados y ramificados / % ácidos grasos saturados) de la membrana citoplasmática de *S. aureus* Newman con la temperatura de crecimiento, en células en fase exponencial (●) y estacionaria (■) de crecimiento.

Los datos que se representan en dicha figura, comparando las diferentes temperaturas de incubación empleadas, concuerdan con lo descrito en la literatura científica (Denich et al., 2003), puesto que se puede observar que conforme aumentaba la temperatura, disminuía la proporción de ácidos grasos ramificados e insaturados, y aumentaba la de los saturados. Tras llevar a cabo los test ANOVA y *t* de Student correspondientes, destacan especialmente las diferencias en las proporciones de ácidos grasos que se encontraron entre las células crecidas a 20 °C y las crecidas al resto de temperaturas (diferencias significativas; $p<0,05$), tanto en fase exponencial como estacionaria. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($p>0,05$) al comparar las demás temperaturas entre sí. Destacan asimismo las diferencias entre las células en fase exponencial y estacionaria, presentando estas últimas una notablemente mayor proporción de ácidos grasos ramificados que las primeras.

Además, también se calcularon otros dos índices indicativos de fluidez: la longitud media de las cadenas de ácidos grasos, y la relación entre el porcentaje de ácidos grasos ramificados en posición iso frente a anteiso. Tal y como se puede observar en las Figuras 4.7 y 4.8, los dos

índices se mantuvieron relativamente constantes en todas las temperaturas de incubación estudiadas y en ambas fases de crecimiento. En el caso de la longitud media de la cadena, se observó cierta tendencia a aumentar con la temperatura de incubación. En las células en fase exponencial se encontraron diferencias significativas ($p<0,05$) entre los 20 y 42 °C de incubación y entre los 30 y 42 °C. Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas ($p>0,05$) entre las diferentes temperaturas de incubación en las células de fase estacionaria. En cuanto a la relación iso/anteiso, también aumentó con la temperatura de incubación, existiendo diferencias significativas ($p<0,05$) para las células en fase exponencial entre la incubación a 42 °C y el resto de temperaturas. En el caso de las células en fase estacionaria, se observó la misma tendencia, solo que además se encontraron diferencias significativas ($p<0,05$) también entre las temperaturas de 20 y 37 °C.

De acuerdo a nuestros resultados, el índice que mayor utilidad presenta para ilustrar los cambios en los ácidos grasos de membrana debidos a los cambios de la temperatura, sería el mostrado en la Figura 4.6 (% ácidos grasos insaturados más ramificados / % saturados).

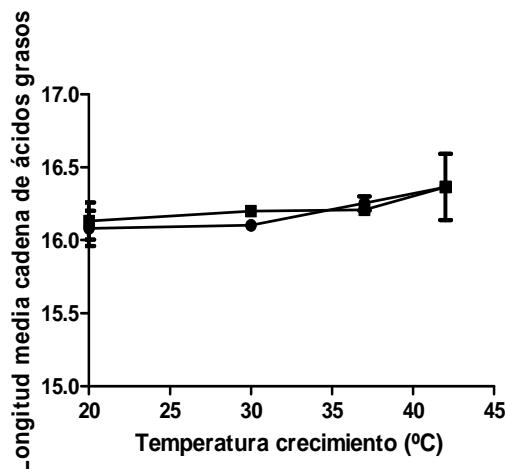


Figura 4.7. Evolución del índice de fluididad (longitud media de la cadena de ácidos grasos) de la membrana citoplasmática de *S. aureus* Newman con la temperatura de crecimiento, en células en fase exponencial (●) y estacionaria (■) de crecimiento.

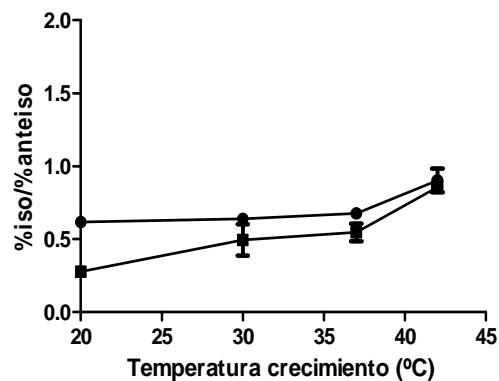


Figura 4.8. Evolución del índice de fluididad (% ácidos grasos iso/ % ácidos grasos anteiso) de la membrana citoplasmática de *S. aureus* Newman con la temperatura de crecimiento, en células en fase exponencial (●) y estacionaria (■) de crecimiento.

Con respecto a la relación entre fluidez de membrana y termorresistencia, y de acuerdo a Beuchat (1978), las células crecidas a temperaturas elevadas, y por tanto, con mayor proporción de ácidos grasos saturados y ácidos grasos con cadenas más largas en sus membranas, de efecto rigidificante, suelen presentar una mayor termorresistencia. Los resultados aquí presentados concuerdan parcialmente con esta hipótesis, ya que se observa una correlación entre la fluidez de la membrana y la termorresistencia que muestran los microorganismos, si las células en fase exponencial y estacionaria se analizan de forma independiente, puesto que las células crecidas a 20 °C poseen una mayor proporción de ácidos grasos ramificados, y muestran una termorresistencia menor que las crecidas a 30, 37 y 42 °C.

No obstante, de acuerdo a la hipótesis de Beuchat (1978), las células que se encuentran en fase exponencial de crecimiento deberían mostrar unas proporciones de ácidos grasos ramificados mayores que las células en fase estacionaria, puesto que poseen una menor termorresistencia. Por lo tanto, de los datos aquí presentados puede concluirse que no se puede establecer una relación directa entre termorresistencia y composición de ácidos grasos de membrana, aunque esta sí que existiría si en la comparación sólo se incluyesen células en la misma fase de crecimiento.

En cualquier caso, es necesario indicar que la fluidez de la membrana también viene determinada por otros componentes además de los ácidos grasos (Denich et al., 2003). De modo que, la mayor termorresistencia de las células en fase estacionaria, posiblemente se debiera a diferencias en el perfil proteico, más (o al menos de igual relevancia) que por la composición en ácidos grasos. Así, las células crecidas a temperaturas más elevadas presentan un perfil proteico diferente, particularmente, con un contenido en HSP más elevado. Estas proteínas desempeñan una gran variedad de funciones celulares, incluyendo la contribución en la eliminación y reparación de proteínas dañadas por acción del calor, o la termoestabilización de estructuras celulares como la membrana, por lo que la presencia de HSP conllevaría una termorresistencia más elevada (Lin y Chou, 2004).

Especialmente interesante resulta esta última función ya que implicaría que, a pesar de su perfil de ácidos grasos de membrana, las células en fase estacionaria de crecimiento podrían presentar una mayor rigidez que las células en fase exponencial. Según los resultados observados en el estudio de Cebrián, Condón y Mañas (2018), esta mayor rigidez podría favorecer los procesos de reparación celular después del tratamiento térmico aplicado. También podría ocurrir que las membranas más rígidas presentaran menos daños severos tras

la exposición al calor, y por tanto, fueran más fáciles de reparar en las condiciones adecuadas. De este modo, parece que el estado físico de la membrana sería un factor determinante en la capacidad de supervivencia de *S. aureus* a los tratamientos térmicos. No obstante, sería necesario comprobar esta hipótesis mediante la medida de la fluidez de la membrana con otros enfoques experimentales que incluyesen el papel del resto de componentes, además del de los ácidos grasos.

En resumen, todos los datos obtenidos indican el papel capital que posee el factor σ^B en el desarrollo de la termorresistencia en función del tiempo y de la temperatura de crecimiento en *S. aureus* Newman. No obstante, su participación directa, es decir, que exista una relación directa entre actividad σ^B y termorresistencia, aún tiene que ser probada, por ejemplo, mediante el uso de un mutante isogénico carente del factor σ^B o mediante la puesta a punto de técnicas para la determinación directa de la expresión del gen *sigB*.

Por otra parte, a la vista de los resultados de composición de ácidos grasos de membrana obtenidos, se puede concluir que si el factor σ^B contribuye a incrementar la rigidez de la membrana de las células de *S. aureus* Newman, no lo haría a través de un cambio en el perfil de ácidos grasos sino a través de cambios en otros componentes de la membrana como proteínas y/o carotenoides. De hecho, mientras que a día de hoy no se ha descrito que el factor σ^B regule la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis de ácidos grasos ramificados (que son los que aumentan al entrar las células en fase estacionaria y los que más cambian en concentración en función de la fase de crecimiento), sí se ha descrito que este factor σ regula la síntesis de carotenoides y de numerosas proteínas de membrana (Bischoff et al., 2004; Pané-Farré et al., 2006).

5. CONCLUSIONES

- 1^a. La utilización de menores temperaturas de incubación resulta en velocidades de crecimiento microbiano más lentas. Así, el crecimiento de *S. aureus* Newman a 20 °C es notablemente más lento que a 30, 37 y 42 °C.
- 2^a. Un incremento en el tiempo de incubación conduce a un incremento en la termorresistencia de *S. aureus* Newman. De este modo, las células en fase estacionaria de crecimiento poseen una mayor termorresistencia que las células que se encuentran en fase exponencial.
- 3^a. Conforme aumenta la temperatura de incubación, aumenta la termotolerancia de las células de *S. aureus* Newman. No obstante, la magnitud de este efecto no es igual para las células en fase exponencial y estacionaria de crecimiento. Así, en el caso de las células en fase exponencial, sólo se observan ligeras diferencias en resistencia entre las diferentes temperaturas estudiadas. Por el contrario, en el caso de las células en fase estacionaria, se observan grandes diferencias en termorresistencia entre las crecidas a 20 °C, y el resto, que muestran un valor D_{54} hasta 2,2 veces más elevado.
- 4^a. Al aumentar la temperatura de cultivo, disminuye la proporción de ácidos grasos ramificados e insaturados en la membrana citoplasmática de *S. aureus* Newman, y aumenta la de los saturados. Además, las células en fase estacionaria presentan una mayor proporción de ácidos grasos ramificados que las células en fase exponencial.
- 5^a. No se puede establecer una relación directa entre termorresistencia y composición de ácidos grasos de membrana de *S. aureus* Newman, aunque esta sí que existiría si en la comparación sólo se incluyesen células en la misma fase de crecimiento.
- 6^a. El factor σ^B jugaría un importante papel en el desarrollo de la termorresistencia en función del tiempo y la temperatura de crecimiento en *S. aureus* Newman. Además, si el factor σ^B contribuye a incrementar la rigidez de la membrana de las células de *S. aureus* Newman, sería a través de cambios en componentes de la membrana como proteínas y/o carotenoides y no de la composición en ácidos grasos.

CONCLUSIONS

1st. The use of lower incubation temperatures results in slower microbial growth rates. Thus, the growth of *S. aureus* Newman at 20 °C is markedly slower than at 30, 37 and 42 °C.

2nd. An increase in the incubation time leads to an increase in the thermoresistance of *S. aureus* Newman. In this way, the cells in stationary phase of growth have a greater thermoresistance than those that are in exponential phase.

3rd. As the incubation temperature increases, the thermotolerance of *S. aureus* Newman cells increases. Nevertheless, the magnitude of this effect is not the same for cells in exponential and stationary phase of growth. Thereby, in the case of cells in the exponential phase, only slight differences in resistance are observed among the different temperatures studied. Conversely, in the case of the cells in stationary phase, large differences in thermoresistance are observed between those grown at 20 °C and the rest, which show a D_{54} value up to 2,2 times higher.

4th. As the culture temperature increases, the proportion of branched and unsaturated fatty acids in the cytoplasmic membrane of *S. aureus* Newman decreases, and that of saturated fatty acids increases. Moreover, cells in stationary phase display a higher proportion of branched fatty acids than cells in exponential phase.

5th. It is not possible to establish a direct relationship between thermoresistance and membrane fatty acid composition of *S. aureus* Newman, although this relationship would exist if only cells in the same growth phase were compared.

6th. The σ^B factor would play an important part in the development of thermoresistance as a function of the growth time and temperature in *S. aureus* Newman. Furthermore, if the σ^B factor contributes to enhance the membrane rigidity of *S. aureus* Newman cells, it would be through changes in membrane components such as proteins and/or carotenoids and not in fatty acid composition.

6. APORTACIONES EN MATERIA DE APRENDIZAJE

El Trabajo de Fin de Grado es una asignatura que me ha supuesto un gran reto, pero asimismo opino que su realización me ha permitido, sin ninguna duda, adquirir una mayor madurez, tanto en el ámbito profesional como en el personal.

Por un lado, llevando a cabo este trabajo he conseguido asentar de manera efectiva conocimientos de diversas áreas relacionadas íntimamente con la carrera de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, y la Microbiología. Además, he aprendido a realizar experimentos con base científica, y posteriormente a analizar rigurosamente los datos obtenidos en dichos experimentos. Para la representación gráfica de los resultados, modelizaciones y análisis estadístico, he empleado herramientas informáticas como GraphPad Prism y GInaFiT, que antes eran desconocidas para mí.

Por otro lado, durante mi experiencia en el laboratorio he logrado mejorar notablemente varias competencias que considero indispensables, como son la autonomía de trabajo, organización, desenvoltura, y aprender a compartir el espacio de trabajo con otras personas.

Cabe destacar asimismo que, tanto durante el periodo transcurrido en el laboratorio, como a la hora de redactar el informe, he aprendido a gestionar adecuadamente el tiempo de trabajo. Esto se debe, en gran parte, a que se ha de conseguir compaginar esta asignatura con el resto de asignaturas de la carrera.

Finalmente, me gustaría mostrar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me han ayudado a lo largo de este trabajo, especialmente a mis directores, Pilar Mañas y Guillermo Cebrián, por su paciencia, dedicación y apoyo en todo momento.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abee, T., & Wouters, J. A.** (1999). “Microbial stress response in minimal processing”. *International Journal of Food Microbiology*, 50 (1-2), pp. 65-91.
- Baird-Parker, T. C.** (2000). “*Staphylococcus aureus*”. In: Lund, B. M., Baird-Parker, T. C., & Gould, G. W. (Eds.). *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Gaithersburg: Aspen Publishers, pp. 1317-1335.
- Beck, H. C.** (2005). “Branched-chain fatty acid biosynthesis in a branched-chain amino acid aminotransferase mutant of *Staphylococcus carnosus*”. *FEMS Microbiology Letters*, 243 (1), pp. 37-44.
- Beuchat, L. R.** (1978). “Injury and repair of gram negative bacteria, with special consideration of the involvement of the cytoplasmic membrane”. *Advances in Applied Microbiology*, 23, pp. 219-243.
- Bigelow, W. D., & Esty, J. R.** (1920). “The thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms”. *The Journal of Infectious Diseases*, 27 (6), pp. 602-617.
- Bischoff, M., Dunman, P., Kormanec, J., Macapagal, D., Murphy, E., Mounts, W., Berger-Bächi, B., & Projan, S.** (2004). “Microarray-based analysis of the *Staphylococcus aureus* σ^B regulon”. *Journal of Bacteriology*, 186 (13), pp. 4085-4099.
- Casp, A., y Abril, J.** (2003). *Procesos de Conservación de los Alimentos*. (2^a ed.) Madrid: Mundi-Prensa.
- Cebrián, G.** (2009). *Mecanismos de inactivación y resistencia de Staphylococcus aureus a diferentes procesos de conservación de los alimentos*. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Cebrián, G., Condón, S., & Mañas, P.** (2017). “Physiology of the inactivation of vegetative bacteria by thermal treatments: Mode of action, influence of environmental factors and inactivation kinetics”. *Foods*, 6 (12), pp. 107.
- Cebrián, G., Condón, S., & Mañas, P.** (2018, aceptado para publicación). “Heat resistance, membrane fluidity and sublethal damage in *Staphylococcus aureus* cells grown at different temperatures”. *International Journal of Food Microbiology*.
- Cebrián, G., Sagarzazu, N., Aertsen, A., Pagán, R., Condón, S., & Mañas, P.** (2009). “Role of the alternative sigma factor σ^B on *Staphylococcus aureus* resistance to stresses of relevance to food preservation”. *Journal of Applied Microbiology*, 107 (1), pp. 187-196.
- Chan, P. F., Foster, S. J., Ingham, E., & Clements, M. O.** (1998). “The *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor σ^B controls the environmental stress response but not

starvation survival or pathogenicity in a mouse abscess model”. *Journal of Bacteriology*, 180 (23), pp. 6082-6089.

Condón, S., Arrizubieta, M. J., & Sala, F. J. (1993). “Microbial heat resistance determinations by the multipoint system with the thermoresistometer TR-SC”. *Journal of Microbiological Methods*, 18 (4), pp. 357-366.

Dawson, R. M. C., Elliot, D. C., Elliot, W. H., & Jones, K. M. (1974). *Data for Biochemical Research*. Oxford: Clarendon Press.

Denich, T. J., Beaudette, L. A., Lee, H., & Trevors, J. T. (2003). “Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes”. *Journal of Microbiological Methods*, 52 (2), pp. 149-182.

EFSA (European Food Safety Authority) & ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). (2015). “The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014”. *EFSA Journal*, 13 (2), pp. e4329. DOI:10.2903/j.efsa.2015.4329.

Fayet, O., Ziegelhoffer, T., & Georgopoulos, C. (1989). “The groES and groEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures”. *Journal of Bacteriology*, 171 (3), pp. 1379-1385.

Geeraerd, A. H., Herremans, C. H., & Van Impe, J. F. (2000). “Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment”. *International Journal of Food Microbiology*, 59 (3), pp. 185–209.

Giachino, P., Engelmann, S., & Bischoff, M. (2001). “ σ^B activity depends on RsbU in *Staphylococcus aureus*”. *Journal of Bacteriology*, 183 (6), pp. 1843-1852.

Jay, J. M. (1992). “High temperature food preservation and characteristics of thermophilic microorganisms”. In: Jay, J. M. (Ed.). *Modern Food Microbiology*. (4th ed.) New York: Chapman & Hall, pp. 335-355.

Kolter, R., Siegele, D. A., & Tormo, A. (1993). “The stationary phase of the bacterial life cycle”. *Annual Review of Microbiology*, 47 (1), pp. 855–874.

Kunitsky, C., Osterhout, G., & Sasser, M. (2005). “Identification of microorganisms using fatty acid methyl ester (FAME) analysis and the MIDI Sherlock Microbial Identification System”. In: Miller M. J. (Ed). *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods* vol3. LLC River Grove, IL, USA: DHI Publishing.

Lemcke, R. M., & White, H. R. (1959). “The heat resistance of *Escherichia coli* cultures of different ages”. *Journal of Applied Microbiology*, 22 (2), pp. 193-201.

- Lin, Y. D., & Chou, C. C.** (2004). “Effect of heat shock on thermal tolerance and susceptibility of *Listeria monocytogenes* to other environmental stresses”. *Food Microbiology*, 21 (5), pp. 605-610.
- Lowy, F. D.** (1998). “*Staphylococcus aureus* infections”. *The New England Journal of Medicine*, 339 (8), pp. 520-532.
- Mackey, B. M.** (2000). “Injured bacteria”. In: Lund, M., Baird-Parker, T. C., & Gould, G. W. (Eds.). *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Gaithersburg: Aspen Publishers, pp. 315-341.
- Pané-Farré, J., Jonas, B., Förstner, K., Engelmann, S., & Hecker, M.** (2006). “The σ^B regulon in *Staphylococcus aureus* and its regulation”. *International Journal of Medical Microbiology*, 296 (4-5), pp. 237-258.
- Russell, N. J.** (1995). “Psychrotrophy and adaptation to low temperatures: microbial membrane lipids. Proceedings of the 19th International Congress on Refrigeration”. *Workshop Refrigeration and Microbiology: Health, Food, Drinks and Flowers*, 1, pp. 359-365.
- Schumann, W.** (2007). “Thermosensors in eubacteria: role and evolution”. *Journal of Biosciences*, 32 (3), pp. 549-557.
- Senn, M. M., Bischoff, M., Von Eiff, C., & Berger-Bächli, B.** (2005). “ σ^B activity in a *Staphylococcus aureus hemB* mutant”. *Journal of Bacteriology*, 187 (21), pp. 7397-7406.
- Shigapova, N., Török, Z., Balogh, G., Goloubinoff, P., Vigh, L., & Horváth, I.** (2005). “Membrane fluidization triggers membrane remodeling which affects the thermotolerance in *Escherichia coli*”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 328 (4), pp. 1216-1223.
- Singer, S. J., & Nicholson, G. L.** (1972). “The fluid mosaic model of the structure of cell membranes”. *Science*, 175 (4023), pp. 720-730.
- Smelt, J. P., & Brul, S.** (2014). “Thermal inactivation of microorganisms”. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54 (10), pp. 1371–1385.
- Tourdot-Maréchal, R., Gaboriau, D., Beney, L., & Diviés, C.** (2000). “Membrane fluidity of stressed cells of *Oenococcus oeni*”. *International Journal of Food Microbiology*, 55 (1-3), pp. 127-131.
- Van Derlinde, E., Bernaerts, K., & Van Impe, J. F.** (2008). “Dynamics of *Escherichia coli* at elevated temperatures: effect of temperature history and medium”. *Journal of Applied Microbiology*, 104 (2), pp. 438-453.

ANEXO

Tabla 1. Resultados (promedio ± desviación estándar) obtenidos en el análisis de ácidos grasos de la membrana citoplasmática de *S. aureus* Newman en función de la fase de crecimiento y de la temperatura de incubación.

ÁCIDO GRASO	FASE ESTACIONARIA				FASE EXPONENCIAL			
	20 °C (%)	30 °C (%)	37°C (%)	42°C (%)	20 °C (%)	30°C (%)	37°C (%)	42°C (%)
10:0	-	0,07±0,01	0,16±0,07	0,18±0,00	0,85±0,37	1,43±0,37	1,12±0,03	-
12:0	-	-	-	-	-	-	0,32±0,45	-
13:0 iso	0,05±0,07	0,19±0,06	0,18±0,01	-	0,47±0,04	0,29±0,41	0,59±0,18	-
14:0 iso	0,64±0,16	4,75±0,68	6,61±0,60	11,53±1,52	3,11±0,40	4,68±0,28	5,63±0,10	12,16±0,16
14:0	0,14±0,01	0,40±0,06	0,45±0,01	1,80±0,22	0,97±0,23	2,78±0,20	3,42±0,05	2,94±0,13
15:1 iso G	-	-	-	0,08±0,11	-	-	-	-
15:0 iso	6,88±1,17	10,20±1,97	9,73±1,06	5,33±0,66	15,45±0,47	13,68±0,29	11,34±0,28	6,09±0,06
15:0 anteiso	50,02±3,18	42,26±2,81	40,49±0,46	30,15±2,55	37,17±1,25	32,99±1,24	30,09±1,41	27,86±2,59
15:0	-	-	-	-	-	-	-	-
16:0 iso	1,32±0,01	3,09±0,01	3,69±0,23	8,41±0,42	2,49±0,14	2,40±0,13	2,71±0,06	6,77±0,08
16:0	1,79±0,14	2,95±0,22	2,28±0,45	3,18±0,12	5,35±0,71	7,61±0,75	7,54±1,20	6,01±1,40
17:0 iso	6,71±0,52	3,00±0,01	2,61±0,18	1,31±0,00	4,04±0,70	2,15±0,15	1,51±0,01	-
17:0 anteiso	14,21±2,86	6,26±1,81	6,22±0,81	4,20±0,13	5,34±0,74	3,21±0,11	2,50±0,09	2,34±0,13
17:0	0,22±0,04	0,63±0,05	0,53±0,04	0,92±0,01	1,27±0,04	0,96±0,04	0,97±0,06	-
18:0 iso	0,63±0,02	1,66±0,04	1,92±0,19	3,46±0,23	0,33±0,46	-	0,25±0,35	2,13±0,15
18:1 w9c	0,16±0,02	0,13±0,01	0,14±0,00	0,26±0,08	0,64±0,19	0,78±0,11	0,60±0,13	1,30±0,28
18:0	6,65±0,87	11,32±0,72	10,67±1,42	12,65±1,92	12,22±0,31	16,76±1,51	18,04±1,85	17,88±3,10
19:0 iso	2,51±0,08	1,53±0,21	1,48±0,26	0,64±0,06	0,52±0,74	-	-	-
19:0 anteiso	3,52±0,81	2,04±0,54	2,11±0,09	2,49±0,50	0,27±0,37	-	-	-
19:0	0,38±0,06	1,45±0,16	1,84±0,13	2,35±0,22	2,14±0,17	1,65±0,04	1,97±0,33	2,35±0,28
20:0 iso	0,05±0,07	0,40±0,04	0,49±0,16	0,85±0,17	-	-	-	-
20:0	4,15±0,42	7,72±1,05	8,45±0,56	10,26±2,06	7,41±0,07	8,69±1,36	11,47±0,49	12,20±1,65