

María Marcén Terraza

Influencia del estrés oxidativo en la inactivación bacteriana por diferentes tecnologías utilizadas para la conservación de los alimentos

Departamento

Producción Animal y Ciencia de los Alimentos

Director/es

Mañas Pérez, Pilar
Condón Usón, Santiago

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Tesis Doctoral

INFLUENCIA DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA
INACTIVACIÓN BACTERIANA POR DIFERENTES
TECNOLOGÍAS UTILIZADAS PARA LA
CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS

Autor

María Marcén Terraza

Director/es

Mañas Pérez, Pilar
Condón Usón, Santiago

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Producción Animal y Ciencia de los Alimentos

2018



Universidad
Zaragoza

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Influencia del estrés oxidativo en la inactivación bacteriana por diferentes tecnologías utilizadas para la conservación de los alimentos.

Memoria para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza presentada por:

María Marcén Terraza

Directores:

Dr. M^a Pilar Mañas Pérez

Dr. Santiago Condón Usón



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Departamento de Producción
Animal y Ciencia de los
Alimentos
Universidad Zaragoza

Dña. M^a Pilar Mañas Pérez y D. Santiago Condón Usón, Profesora Titular y Catedrático, respectivamente, del Área de Tecnología de los Alimentos del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza,

Certifican:

Que la Tesis Doctoral titulada “Influencia del estrés oxidativo en la inactivación bacteriana por diferentes tecnologías utilizadas para la conservación de los alimentos”, de la que es autora María Marcén Terraza, ha sido realizada bajo su dirección, su contenido se corresponde con el Proyecto de Tesis aprobado en su momento y cumple las condiciones requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

En Zaragoza, a 11 de Junio de 2018

Fdo: M^a Pilar Mañas Pérez

Fdo: Santiago Condón Usón

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a un Contrato Predoctoral de Personal Investigador en Formación del Departamento de Innovación, Investigación y Universidad del Gobierno de Aragón y del Fondo Social Europeo (C093/2014) y a los proyectos “Influencia del estrés oxidativo en la inactivación bacteriana por diferentes tecnologías utilizadas para la conservación de los alimentos” (AGL2012-33522, MINECO-FEDER) y “Búsqueda de estrategias de conservación de alimentos que aseguren la inactivación de los microorganismos más resistentes (esporos y/o mutantes anormalmente resistentes)” (AGL2015-69565-P, MINECO-CICYT).

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero dar las gracias a mis dos directores, la Dr. M^a Pilar Mañas Pérez y el Dr. Santiago Condón Usón, por ofrecerme la gran oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral. A Pilar, muchas gracias por sumergirme en este mundo tan apasionante de la fisiología microbiana, por su entusiasmo y apoyo en todo momento, por su gran esfuerzo, por sus consejos, y por enseñarme a mirar más allá. A Santiago, muchas gracias por tener siempre la puerta de su despacho abierta, y por sus consejos científicos, mecánicos y personales. En definitiva, gracias a ambos por dedicarme tanto tiempo, gracias por toda vuestra motivación y por ayudarme a crecer tanto profesional como personalmente.

En segundo lugar, quiero dar las gracias a los Drs. Rafael Pagán, Javier Raso, Nacho Álvarez, Diego García y Guillermo Cebrián por ofrecerme su ayuda siempre que fue necesario y por animarme, sobre todo, durante este último año.

En tercer lugar, quiero dar las gracias a los Drs. Abram Aertsen, Chris Michiels y Elisa Gayán por haberme acogido en el laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Católica de Lovaina durante 3 meses, y por enseñarme tanto sobre biología molecular. Gracias también a todos mis compañeros de allí, sobre todo, a Oscar y Verónica.

En cuarto lugar, también quiero dar las gracias a todos mis compañeros de Tecno, de P.A.C.A. (carne, leche y vegetales), por esos buenos ratos tanto dentro como fuera del laboratorio. Y, especialmente, quiero dar las gracias a Make y a Bea, por su inestimable ayuda, por enseñarme durante mis primeros meses en el laboratorio, por su amistad y por esas merienditas. Gracias también a Virginia, por esos cafés de por la mañana, por trabajar conmigo codo con codo haciendo que cada día resulte tan interesante y por intentar sumergirme en el mundo de las cervezas. Gracias a Salomé, por todos los momentos increíbles que hemos vivido juntas en los congresos, por estar siempre tan pendiente y por enseñarme siempre a ver el lado positivo de las cosas. Gracias a Elisa Luengo y a Guillermo Saldaña, por esas excursiones de "PACA WildLife" y por esos partidos de basket. Gracias a Silvia, por dejarme participar en sus experimentos de las especias, por su confianza y por lograr arrancarme siempre una sonrisa. Gracias a Dani Berdejo, Juanma, Diana, Adriana, Marcos, Carlota y Elisa P., por hacer que el laboratorio haya sido un

segundo hogar para mí. Y, gracias también a “Carmen Carmen” por su trabajo, por sus consejos, por esas fiestas y por animar P.A.C.A.

Además, quiero dar las gracias a mis amigas que siempre me han apoyado, animado y motivado a seguir. En especial, quiero dar las gracias a Agos y a Leti, por manteneros siempre a mi lado y por dejarme formar parte de vuestro día a día. Gracias también a mis compis del Máster (Vega, Rocío, Sara y Andrea), por su apoyo aun cuando las distancias nos separan.

Por último, aunque no menos importante, quiero dar las gracias a mi familia. A mis padres, por su amor incondicional, por creer siempre en mí, por haberme animado a hacer siempre lo que me gusta, por aguantarme en los momentos malos y por motivarme a seguir “cuidando de mis bichitos”. A mis hermanos, Ana, Sara y José, porque sin ellos mi vida no sería la misma. Gracias Anita por esas comiditas juntas, por hacerme de taxista, por compartir las penas y agobios, y por motivarnos mutuamente. Gracias Sara por esas meriendas y manualidades para despejarme, por ser siempre tan feliz y contagiármelo, y por esas cenas de los sábados. Y, gracias José, por ser el mejor hermano del mundo, y por compartir conmigo tantos hobbies e ilusiones. Gracias a los tres por estar siempre ahí y por poder contar siempre con vosotros. Gracias también a mi yaya Lola, por su cariño y por esas “bolitas” que todo lo pueden. Gracias a mis tíos y primos, por todo su apoyo.

RESUMEN

La industria alimentaria se esfuerza cada día más en suministrar al consumidor alimentos seguros y estables manteniendo sus propiedades organolépticas y nutritivas. El tratamiento térmico es, actualmente, la tecnología más empleada para lograr este objetivo. Sin embargo, esta tecnología presenta diversos efectos adversos sobre los alimentos, por lo que, en los últimos años se está llevando a cabo un gran esfuerzo en la mejora de estos tratamientos y en la puesta a punto de nuevos sistemas de inactivación microbiana. Algunos de estos sistemas son las altas presiones hidrostáticas (APH), los pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV) o el uso de compuestos antimicrobianos naturales, además de la combinación de varios de estos agentes con el fin de conseguir un efecto sinérgico. No obstante, para un buen diseño de los tratamientos a aplicar es necesario conocer en profundidad los mecanismos implicados en la inactivación microbiana por cada tecnología, es decir, las estructuras y funciones afectadas durante los tratamientos. Durante los últimos años un nuevo concepto ha ganado gran importancia, el estrés oxidativo. Se considera que un desequilibrio entre las sustancias antioxidantes y prooxidantes, en favor de estas últimas, provocaría la aparición de radicales libres en el interior celular que podrían dañar diferentes estructuras dentro de las mismas, afectando así a la supervivencia celular durante y tras el tratamiento. No obstante, se desconoce si la aparición de estrés oxidativo se produce durante los tratamientos con todas las tecnologías, y si hay una relación entre el daño en las diferentes estructuras y la aparición de este desequilibrio.

Así, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue describir si el estrés oxidativo era un mecanismo común de inactivación celular en todas las tecnologías estudiadas y si había una relación entre el estrés oxidativo, el daño en diversas estructuras celulares y la inactivación y/o supervivencia celular. Para ello, utilizando *Escherichia coli* como microorganismo modelo, se llevó a cabo la puesta a punto de diversas técnicas para estudiar de manera directa o indirecta la aparición de desequilibrios oxidativos tras los diversos tratamientos y, posteriormente, se realizó un estudio para cada una de las tecnologías y una comparación de los resultados obtenidos. Se realizó un mayor esfuerzo experimental en el caso de los tratamientos térmicos.

Los resultados obtenidos mostraron generación de estrés oxidativo en todos los tratamientos estudiados (calor, APH, PEAV y acidez). Sin embargo, el nivel de especies reactivas detectadas en el interior celular tras los tratamientos varió entre microorganismos, entre tecnologías, y dentro de cada una de ellas también se observó una variación en el nivel de los diferentes radicales estudiados. Además, se analizó la presencia de daños en otras

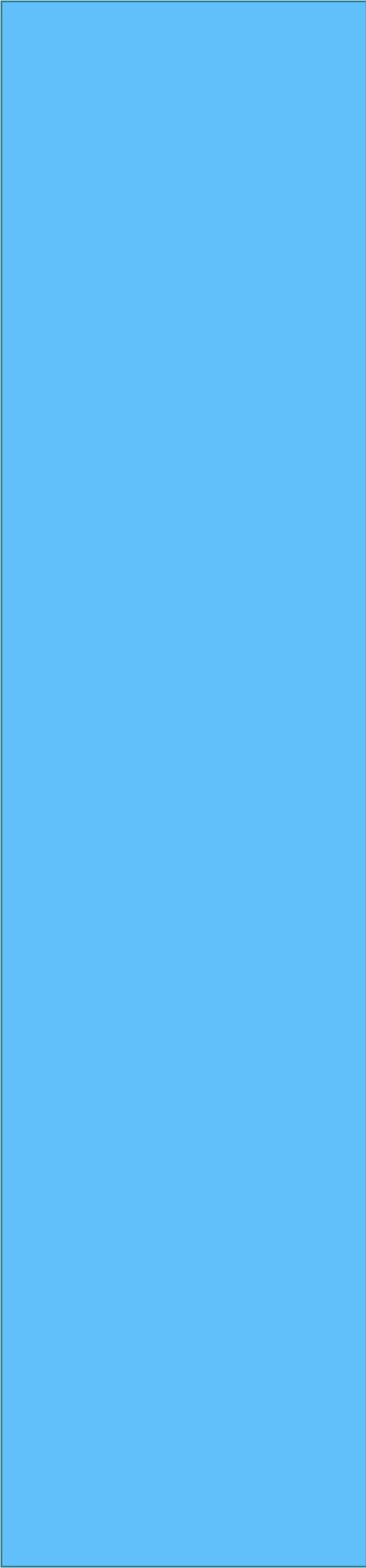
estructuras como las membranas, proteínas y ADN, poniéndose de manifiesto la gran importancia de los fenómenos relacionados con el daño al ADN para las células tratadas por acidez, y de la agregación de proteínas citoplasmáticas en el caso de las células tratadas por altas presiones.

Por otro lado, se observó una gran influencia de las condiciones de recuperación en la inactivación microbiana. Así, unas condiciones de ausencia de oxígeno y medio mínimo con un bajo potencial redox, favorecía notablemente la supervivencia microbiana. En el caso particular de los esporos bacterianos la recuperación en medio mínimo tras el tratamiento térmico determinó en gran medida la capacidad de germinación y con ello el porcentaje de supervivientes.

Del mismo modo, el uso de determinadas sustancias quelantes o antioxidantes durante el crecimiento, tratamiento y/o recuperación celular también favorecerían la recuperación y supervivencia microbiana. A modo de ejemplo, el glutatión, ampliamente estudiado durante esta Tesis Doctoral, ejerció un gran efecto protector si se añadía durante el tratamiento térmico, disminuyendo el nivel de ROS y de daños en diferentes estructuras estudiadas, muy especialmente en la fracción proteica. No obstante el efecto del glutatión dependió tanto de la concentración como de la tecnología estudiada.

Así, el desarrollo de esta Tesis Doctoral requirió de la puesta a punto y aplicación de diversas técnicas, directas e indirectas, para el estudio de la generación de estrés oxidativo y de diferentes daños en el interior celular durante los diferentes tratamientos aplicados y para evaluar la posible recuperación de estos daños al someter a las células a diferentes condiciones ambientales. De este modo, conociendo en profundidad los mecanismos implicados en la inactivación microbiana y las posibles condiciones que favorecerían la supervivencia microbiana, la industria alimentaria podrá diseñar procesos de conservación de alimentos más efectivos.

ÍNDICE

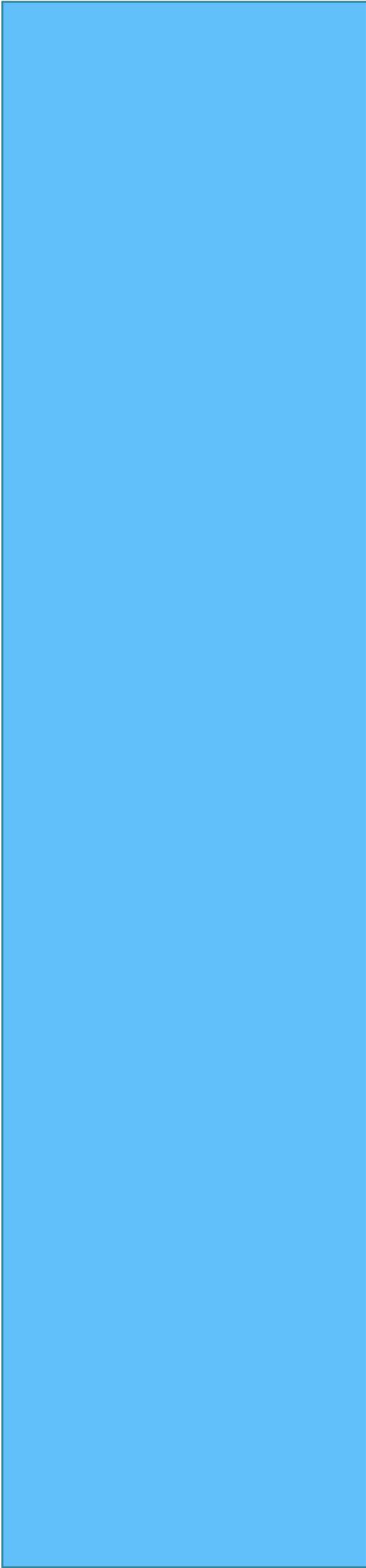


1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS	3
1.2 FISIOLÓGÍA DE LA INACTIVACIÓN MICROBIANA	6
1.2.1 Aspectos fisiológicos celulares de relevancia en la supervivencia e inactivación celular	6
1.2.1.1 Células vegetativas	6
1.2.1.1.1 Dianas celulares y su importancia en la viabilidad	6
1.2.1.1.1.1 Componentes celulares críticos	9
1.2.1.1.2 Alteraciones en el mantenimiento de la homeóstasis: estrés oxidativo ..	17
1.2.1.1.2.1 La evolución bacteriana y la aparición del término “estrés oxidativo” .	18
1.2.1.1.2.2 Generación, control y eliminación de los radicales libres en los organismos	21
1.2.1.1.2.3 Reacciones y daños causados en las células	28
1.2.1.2 Aspectos particulares de los esporos bacterianos	31
1.2.1.2.1 La esporulación y sus factores de transcripción	31
1.2.1.2.1.2 Estructura del espora	33
1.2.1.2.1.3 Resistencia del espora a diferentes agentes	36
1.2.1.2.1.4 La germinación: vuelta a la forma vegetativa	38
1.2.1.3 Daño subletal y su reparación	41
1.2.2 Cinética de inactivación, modelos predictivos y su relación con la fisiología microbiana	45
1.3 INACTIVACIÓN POR DIVERSOS AGENTES UTILIZADOS EN LA CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS	55
1.3.1 Tratamiento térmico	55
1.3.1.1 Introducción	55
1.3.1.2 Eficacia letal sobre diferentes microorganismos	55
1.3.1.3 Mecanismos de inactivación por el calor. Dianas celulares	57
1.3.1.4 Cinética de inactivación por calor	61
1.3.1.5 Factores que influyen en la inactivación microbiana por el calor	62
1.3.2 Altas presiones hidrostáticas	71
1.3.2.1 Introducción: definición, evolución histórica y parámetros de tratamiento. .	71
1.3.2.2 Eficacia letal sobre diferentes microorganismos	73
1.3.2.3 Mecanismos de inactivación por APH. Dianas celulares	75
1.3.2.4 Cinética de inactivación por altas presiones hidrostáticas	79

1.3.2.5	Factores que influyen en la inactivación microbiana por APH.....	80
1.3.3	Pulsos eléctricos de alto voltaje	84
1.3.3.1	Introducción: definición, evolución histórica y parámetros de tratamiento ..	84
1.3.3.2	Eficacia letal sobre diferentes microorganismos	87
1.3.3.3	Mecanismos de inactivación por pulsos eléctricos de alto voltaje. Dianas celulares	88
1.3.3.4	Cinética de inactivación por pulsos eléctricos de alto voltaje	92
1.3.3.5	Factores que influyen en la inactivación microbiana por pulsos eléctricos de alto voltaje.....	93
1.3.4	Acidez	98
1.3.4.1	Introducción.	98
1.3.4.2	Eficacia letal sobre diferentes microorganismos	99
1.3.4.3	Mecanismos de inactivación por acidez. Dianas celulares.....	101
1.3.4.4	Cinética de inactivación por acidez	104
1.3.4.5	Factores que influyen en la inactivación microbiana por acidez.	105
1.4	CONOCIMIENTO ACTUAL ACERCA DE LA RELACIÓN ENTRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA INACTIVACION CELULAR POR CALOR, APH, PEAV Y ACIDEZ	108
2.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	117
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	121
3.1	Microorganismos.....	123
3.2	Medios de cultivo y de tratamiento.....	123
3.3	Suspensiones de trabajo y curvas de crecimiento	125
3.4	Determinaciones de resistencia	127
3.4.1	Determinaciones de resistencia al calor	127
3.4.2	Determinaciones de resistencia a las APH	130
3.4.3	Determinaciones de resistencia a los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEAV).....	132
3.4.4	Determinaciones de resistencia a la acidez	133
3.4.5	Determinaciones de resistencia a otros tratamientos.....	134
3.5	Incubación y recuento de supervivientes	135
3.6	Curvas de supervivencia.....	138
3.7	Tinciones, citometría de flujo y microscopía de fluorescencia	140
3.8	Detección de daños en el ADN: PCR y electroforesis.....	144
3.9	Construcción de cepas mutantes	146
3.10	Determinación de la concentración de proteína total soluble intracelular.....	149

3.11	Determinación de la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y β -galactosidasa	150
3.12	Determinación de la concentración de glutatión.....	152
3.13	Análisis estadístico de los datos.....	153
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	155
4.1	Desarrollos metodológicos.....	157
4.1.1	Efecto de la adición de sustancias quelantes en el crecimiento de <i>E. coli</i> en medio sólido.....	159
4.1.2	Medio mínimo M9-glucosa-cisteína.....	160
4.1.3	Puesta a punto de las técnicas de tinción con fluorocromos.....	163
4.2	Estrés oxidativo e inactivación por calor.....	179
4.2.1	Manuscrito I: Oxidative stress in <i>E. coli</i> upon exposure to heat treatments....	179
4.2.2	Manuscrito II: Exposure to oxygen and bacterial survival to heat treatments.	179
4.3	Influencia del estrés oxidativo en las diversas tecnologías.....	197
4.3.1	Manuscrito III: Cellular events involved in <i>E. coli</i> cells inactivation by several technologies for food preservation: a comparative study.....	197
4.4	Efecto del glutatión en la inactivación microbiana por diversas tecnologías.	211
4.4.1	Manuscrito IV: Protective effect of glutathione on <i>E. coli</i> cells upon lethal heat stress.	211
4.4.2	Manuscrito V: Role of glutathione on <i>E. coli</i> resistance to technologies of food preservation	211
4.5	Exploración del efecto de la recuperación en medio mínimo en la termorresistencia de los esporos de <i>B. subtilis</i>	229
5.	DISCUSIÓN GENERAL.....	259
6.	CONCLUSIONES	279
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	284

INTRODUCCIÓN



1.1 CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS

La Industria Alimentaria desempeña un papel clave en el conjunto de los sectores económicos, ocupando un primer lugar en la rama industrial; y es una pieza fundamental en la cadena alimentaria, ya que se sitúa como eslabón intermedio, aportando valor añadido a la producción primaria y siendo el principal consumidor del sector agrario. Además, está continuamente innovándose, reinventándose y adaptándose a las nuevas tecnologías y costumbres y a las nuevas exigencias de los consumidores, participando en su día a día de algo tan cotidiano y tan necesario como es una buena alimentación.

Durante los últimos años las exigencias de los consumidores han cambiado notablemente. Así, el mercado actual exige a la industria alimentos con una prolongada vida útil, de mayor calidad, que conserven sus propiedades nutritivas y organolépticas, con una menor cantidad de aditivos y, cada vez más, con propiedades beneficiosas para la salud como pueden ser, por ejemplo, reducción de grasas saturadas o menor adición de azúcares. Además, los consumidores actualmente tienden a exigir un envasado atractivo y cómodo que sea respetuoso con el medio ambiente. Y, por supuesto, todo ello manteniendo los niveles de seguridad.

INTRODUCCIÓN

En definitiva, los métodos de conservación de los alimentos deberían poseer las siguientes características (Raso y Barbosa-Cánovas, 2003):

- Prolongar la vida útil y mejorar la seguridad mediante la inactivación de agentes alterantes y patógenos.
- Evitar la alteración de las propiedades organolépticas y nutritivas de los alimentos.
- No dejar residuos en el alimento.
- Ser barato y de fácil aplicación.
- No encontrar objeciones por parte de los consumidores o de la legislación.

Actualmente, las tecnologías tradicionales de conservación de alimentos siguen siendo las más utilizadas, entre las cuales, la más conocida es el tratamiento térmico. Esta tecnología ha sido ampliamente utilizada por la industria alimentaria debido a su capacidad para producir alimentos estables y seguros. Además, el procesado térmico cumple con la mayoría de las características citadas anteriormente. Sin embargo, no permite resolver los problemas de calidad sensorial y nutricional que se producen durante el procesado debido a las altas temperaturas, ni satisfacer todas las exigencias de los consumidores, por lo que, durante los últimos años se están llevando a cabo un elevado número de investigaciones con objeto de mejorar los métodos de conservación. Para ello, los estudios están siendo dirigidos hacia dos vías de gran interés como son la puesta a punto de nuevas tecnologías de conservación de alimentos y los procesos combinados.

Las nuevas tecnologías de conservación de alimentos tienen como principal objetivo la producción de alimentos con una mayor calidad sensorial y nutricional, y, a su vez, una elevada seguridad microbiológica. Entre ellas destacan las altas presiones hidrostáticas, los ultrasonidos, los pulsos eléctricos de alto voltaje, y los nuevos agentes antimicrobianos (Raso y Barbosa-Cánovas, 2003). Actualmente, algunas de estas novedosas tecnologías ya se están aplicando a nivel industrial en ciertos alimentos, por ejemplo, las altas presiones hidrostáticas para la conservación de productos cárnicos, frutas, verduras, zumos, pescado y marisco, lácteos, salsas, platos preparados e, incluso, para alimentos infantiles (Hiperbaric); mientras que otras, como los ultrasonidos o los pulsos eléctricos de alto voltaje, se encuentran aún en fase de investigación, realizándose numerosos estudios a nivel de planta piloto.

Por otro lado, los procesos combinados consisten en aplicar varias tecnologías a baja intensidad para lograr un efecto sinérgico entre ellas (Leistner, 2000; Raso y Barbosa-Cánovas, 2003). Este concepto está ganando gran interés debido a las exigencias por parte del consumidor de productos mínimamente procesados. Los productos mínimamente procesados

se conservan gracias a la aplicación simultánea o sucesiva de dos o más métodos de conservación para prolongar la vida útil y garantizar alimentos seguros, afectando mínimamente a su calidad. Normalmente, la intensidad a la que se aplican cada uno de los métodos no permitiría la conservación de los alimentos si se usasen de manera individual, pero al combinarlos se consigue el efecto deseado (Gould, 1995; Leistner, 2000). Los procesos combinados pueden incluir tecnologías emergentes, como las antes mencionadas, y también tecnologías tradicionales como es el calor, el descenso de la actividad de agua o la acidificación del alimento, entre otras.

Sin embargo, aunque las exigencias por parte del consumidor, en cuanto a calidad nutricional y organoléptica de los alimentos, cada vez son más elevadas, la exigencia más importante es la producción de alimentos seguros. Por ello, para cumplir sus objetivos, los diferentes métodos de conservación de alimentos deben ser eficaces frente a diferentes agentes de alteración (entendiendo por alteración la pérdida de aptitud para el consumo) que según su naturaleza pueden dividirse en: agentes físicos (agentes mecánicos, temperatura, tiempo, etc.), agentes químicos (metales pesados, oxígeno del aire, pH, acidez, etc.) y agentes biológicos (insectos, pájaros, roedores, etc., procesos metabólicos diversos, enzimas endógenos, microorganismos). De todos ellos, los microorganismos (mohos y levaduras, diversos parásitos, virus y, sobre todo, células bacterianas) son los principales causantes de la alteración de los alimentos, y en consecuencia de elevadas pérdidas económicas, y de la aparición de toxiinfecciones alimentarias, constituyendo un riesgo importante para la salud pública.

1.2 FISIOLOGÍA DE LA INACTIVACIÓN MICROBIANA

1.2.1 Aspectos fisiológicos celulares de relevancia en la supervivencia e inactivación celular

1.2.1.1 Células vegetativas

1.2.1.1.1 Dianas celulares y su importancia en la viabilidad

Según Breeuwer y Abee (2000) los principales requerimientos de una célula para ser viable son: una membrana citoplasmática intacta, que permite la separación entre el medio externo y el interior celular; la transcripción del ADN y la traducción del ARN; la generación de energía para el mantenimiento del metabolismo celular; la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y otros componentes celulares; y, por último, la capacidad para crecer y multiplicarse.

Otros autores, como Mackey (2000), definen la viabilidad como la capacidad de los microorganismos para multiplicarse aunque también hay definiciones alternativas como la capacidad para mantener la homeostasis dentro de cada célula individual. Sin embargo, según Mackey (2000), determinar la viabilidad celular es conflictivo y hay que especificar el método de medida, las condiciones de recuperación y el método usado para evaluar la multiplicación celular. Algunas formas de evaluar la multiplicación celular son: la observación de la formación de colonias en medios sólidos, la generación de turbidez en medios líquidos, u otros métodos, que suelen ser menos utilizados, como la observación de la división binaria a través del microscopio. Actualmente se han descrito otros métodos indicadores de viabilidad que se basan en la detección de fluorescencia mediante el uso de determinados colorantes que permiten valorar diversas actividades metabólicas. Según Breeuwer y Abee (2000) estos nuevos métodos tienen la ventaja de ser más rápidos y de permitir observar la actividad de los microorganismos incapaces de formar colonias, tales como los dañados subletalmente, los viables pero no cultivables o los que se encuentran en periodo de latencia y no se pueden dividir en el momento de la medida.

Desde un punto de vista práctico, el objetivo principal de los métodos de conservación de alimentos sería actuar sobre los componentes importantes para el mantenimiento de la viabilidad bacteriana, de manera que al dañarlos se provocase la pérdida de la capacidad de multiplicación celular y provocasen su muerte. Estos componentes considerados esenciales para el crecimiento celular se llaman componentes críticos. Un **componente crítico** es aquel

cuya destrucción o inactivación conduce a la muerte celular por ser imprescindible para la replicación celular e irrecuperable tras su inactivación. Sin el cumplimiento de estos dos requisitos un componente no se consideraría crítico. Por ejemplo, aquellos componentes que pueden ser reparados o sintetizados de nuevo tras la exposición al agente estresante no se considerarían críticos. Algunos casos son, por ejemplo, algunas enzimas, que pueden ser resintetizadas tras el tratamiento, o algunos genes que pueden ser reparados y de nuevo expresados. Por otro lado, algunos componentes que se considerarían claramente críticos serían las envolturas celulares, aquellos constituyentes implicados en la transducción y traducción, como la ARN polimerasa o los ribosomas, ciertos fragmentos de ADN, ciertas proteínas y algunos enzimas específicos.

De acuerdo con esta clasificación, sería relativamente fácil la identificación de aquellos “componentes críticos” o “dianas celulares” y la actuación sobre estos mediante diferentes tratamientos con el fin de lograr la inactivación celular. Sin embargo, cada componente tiene ciertas particularidades que dificultan esta actuación, y, además, la interrelación entre ellos también dificulta el análisis de los resultados. Por ejemplo, la membrana celular como tal se considera un compuesto crítico únicamente cuando pierde su integridad en un grado tan elevado que no es capaz de mantener la homeostasis dentro de la célula o se produce una salida masiva de componentes citoplasmáticos, ya que esto impide la reparación de las diferentes estructuras celulares, incluyendo la de la propia membrana. Por otro lado, la alteración del metabolismo de una célula se debe, generalmente, a la inactivación enzimática durante el tratamiento aplicado. Sin embargo, también puede darse la posibilidad de que sea la alteración de la permeabilidad de la membrana la que produzca cambios en la accesibilidad enzima-substrato, llevando a tal alteración del metabolismo que sea irreversible.

En consecuencia, la letalidad de un tratamiento dependerá de su capacidad para alterar un componente crítico hasta impedir su reparación, bien por efecto directo o bien por producir una alteración simultánea de otro componente celular. En resumen, según lo explicado anteriormente, las posibilidades de alteración e inactivación celular son muy diversas. Además, en la práctica se han descrito numerosas situaciones intermedias en las que el daño producido en los componentes celulares no alcanza suficiente intensidad como para superar un determinado umbral, obteniéndose de esta manera células subletalmente dañadas en uno o varios componentes. Estas células poseen la capacidad de revertir los daños producidos durante el tratamiento si las condiciones de recuperación son adecuadas (Mackey, 2000). Por otro lado, las respuestas de resistencia propias de las células que se someten al tratamiento también influyen en el grado de daño e inactivación. Por ejemplo, las células que han sido

INTRODUCCIÓN

sometidas previamente a un choque térmico no letal durante su crecimiento tienen activos numerosos sistemas de defensa que previenen la inactivación celular y promueven la reparación de los daños presentes en la célula tras someterse al tratamiento térmico (Arsène y col., 2000).

En resumen, la capacidad de una célula para sobrevivir a determinados agentes dependerá de:

- La resistencia intrínseca propia de las estructuras y funciones de la célula frente al agente estudiado.
- La capacidad celular para reparar aquellas estructuras o funciones que hayan sido dañadas durante el tratamiento.
- La capacidad de la célula para adaptarse o desarrollar resistencia frente a dicho agente, ya sea incrementando su resistencia o mejorando su capacidad de reparación.

Para explicar, de manera sencilla, las posibilidades a las que se enfrenta una célula cuando es sometida a un agente estresante, se muestra la figura 1.1.

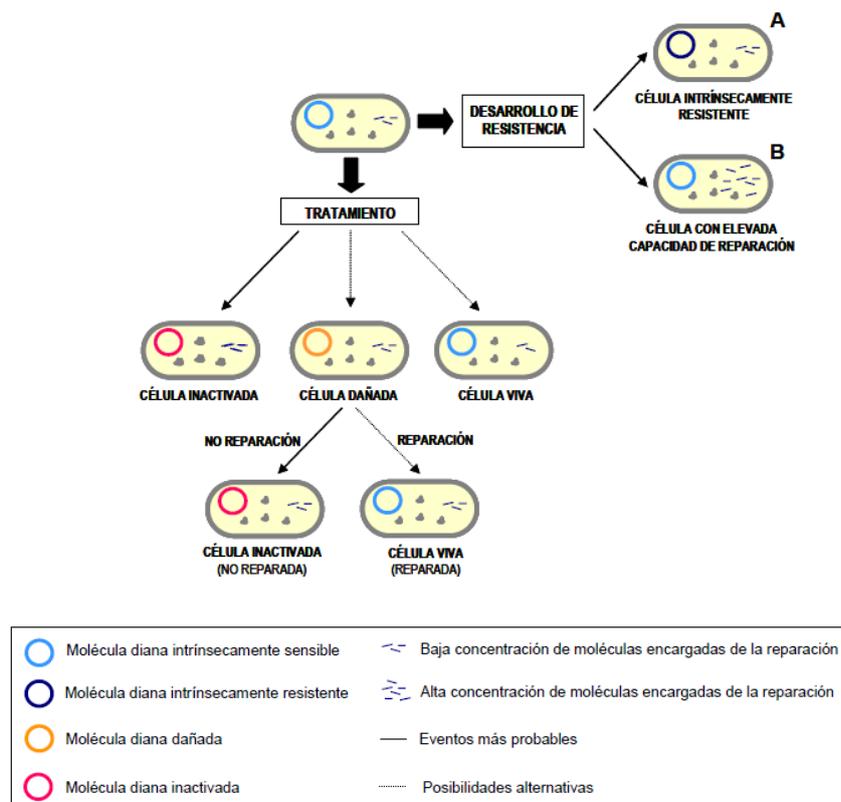


Figura 1.1. Esquema de los fenómenos que determinan la supervivencia celular (Cebrián, 2009).

1.2.1.1.1.1 Componentes celulares críticos

Como ya se ha explicado anteriormente, el estudio de los componentes críticos es de gran importancia a la hora de mejorar la conservación de los alimentos, ya que la afectación a niveles irreparables de uno o varios de estos componentes conduciría a la muerte celular. Algunos de estos componentes son las envolturas celulares, el ADN, los ribosomas y el ARN y las proteínas y enzimas específicos.

- Envolturas celulares

Las envolturas celulares constituyen la barrera que separa el interior celular del entorno que rodea a las células. Por ello, estas estructuras se consideran de gran importancia en la defensa celular frente a diversos agentes, tanto físicos como químicos, ya que son el primer punto de contacto de la célula con el exterior. Como ya se ha descrito anteriormente, las envolturas celulares difieren entre las células vegetativas Gram-positivas y Gram-negativas.

Como se muestra en la figura 1.2 las envolturas de las bacterias Gram-positivas están compuestas por una pared celular, en la parte externa, y una membrana citoplasmática, mientras que las Gram-negativas presentan una membrana externa, cuya composición y funciones varían con respecto a la membrana citoplasmática, un espacio periplásmico entre las dos membranas, en el que se encuentra la pared celular o pared de peptidoglicano, mucho más estrecha que en el caso de las bacterias Gram-positivas, y una membrana citoplasmática. Estas diferencias en su estructura hacen que presenten diferente resistencia a los agentes estresantes.

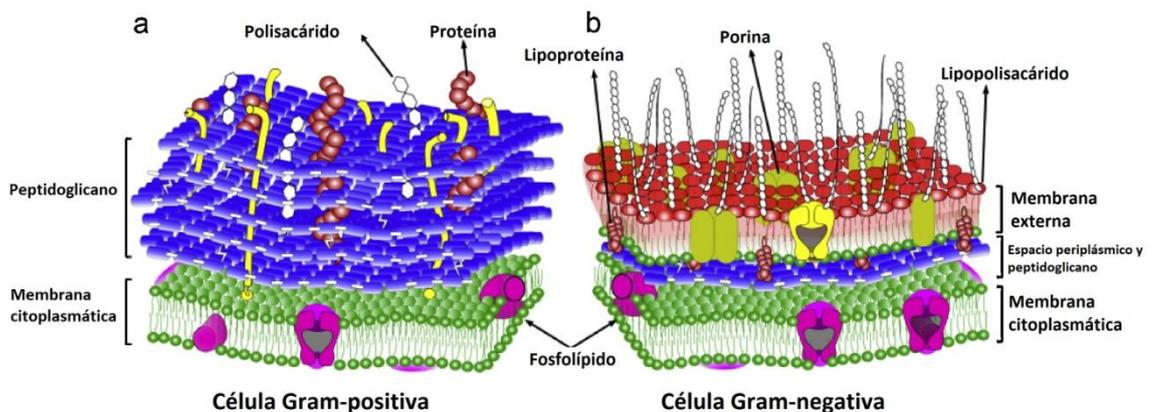


Figura 1.2. Estructura de las envolturas celulares de las bacterias Gram-positivas (a) y Gram-negativas (b) (adaptada de Tripathi y col., 2012).

INTRODUCCIÓN

La **membrana externa**, propia de las bacterias Gram-negativas, está compuesta principalmente por lipopolisacáridos (LPS), en el exterior, y por fosfolípidos, en el interior (Bos y col., 2007). La unión estrecha entre los lípidos y los polisacáridos en la capa externa forman estructuras lipopolisacáridicas específicas que le confieren carga negativa a la superficie celular, impidiendo de este modo el paso de compuestos hidrofóbicos como las sales biliares y los antibióticos (Gunn, 2000; Delcour, 2009). Sin embargo, aunque la membrana externa no permite la entrada de enzimas u otras moléculas de gran tamaño, esta membrana, a diferencia de la citoplasmática, es relativamente permeable a pequeñas moléculas. Esto es posible gracias a las porinas, unas proteínas que actúan como canales de entrada y salida de sustancias hidrofílicas de bajo peso molecular, mediante transporte pasivo. Actualmente se cree que, además del control de la entrada de moléculas al interior celular, una de las principales funciones de esta membrana es el mantenimiento de determinadas enzimas que se hallan en el periplasma, evitando su difusión hacia el entorno. Estas enzimas presentan diversas funciones, que se pueden observar en las bacterias Gram-negativas, pero no en las Gram-positivas, como son: degradación inicial de las moléculas de los nutrientes, por medio de enzimas hidrolíticas; transporte de sustratos hasta la membrana citoplasmática, mediante proteínas de unión; y producir respuestas quimiotácticas, mediante quimiorreceptores (Bos y col., 2007).

La **pared celular** está compuesta principalmente de peptidoglicano y su función principal es aportar forma y rigidez a las células, protegiendo así a la membrana citoplasmática. Esta pared difiere entre las células Gram-positivas y Gram-negativas. Las primeras presentan una pared celular mucho más gruesa, en la que los peptidoglicanos están dispuestos en numerosas capas y suponen hasta un 90% de la pared, mientras que en las segundas los peptidoglicanos suponen alrededor de un 10% y se presentan formando una única capa. Esta pared de peptidoglicano está formada por dos derivados de azúcares: *N-acetilglucosamina* y *N-acetilmurámico*, y un pequeño grupo de aminoácidos como L y D-alanina, D-glutámico y lisina. Los azúcares se unen entre sí, mediante enlaces glucosídicos (β 1-4), formando una estructura llamada "tetrapéptido del glicano". Sin embargo, no son estos enlaces los que le confieren rigidez, sino el entrecruzamiento a través de puentes peptídicos. No obstante, la rigidez otorgada por esta estructura no evita que exista un cierto grado de flexibilidad que permite cambios de forma cuando las células son sometidas a diversos agentes ambientales. Hay que tener en cuenta que si estos cambios producen alteraciones en la membrana, se producirían cambios en la permeabilidad y en las funciones de pared, y en el caso de las bacterias Gram-

negativas también de la membrana externa, que podría perder su estabilidad estructural (Costerton y col., 1974; Madigan y col., 2009).

La **membrana citoplasmática** es una fina capa que rodea completamente al citoplasma celular. A pesar de tener sólo 8 nm de espesor, esta barrera es vital y separa el interior celular del entorno que le rodea. Esta membrana está formada por una bicapa lipídica en la que los fosfolípidos poseen unidades altamente hidrofóbicas, como los ácidos grasos, y unidades relativamente hidrofílicas, como el glicerol. Los fosfolípidos tienden a formar bicapas de manera espontánea en soluciones acuosas, en las que los ácidos grasos se encuentran en el interior, manteniendo un entorno hidrofóbico, mientras que las porciones hidrofílicas se orientan hacia la fase acuosa exterior. Esta estructura de bicapa de las membranas es la organización más estable de las moléculas lipídicas situadas en un entorno acuoso.

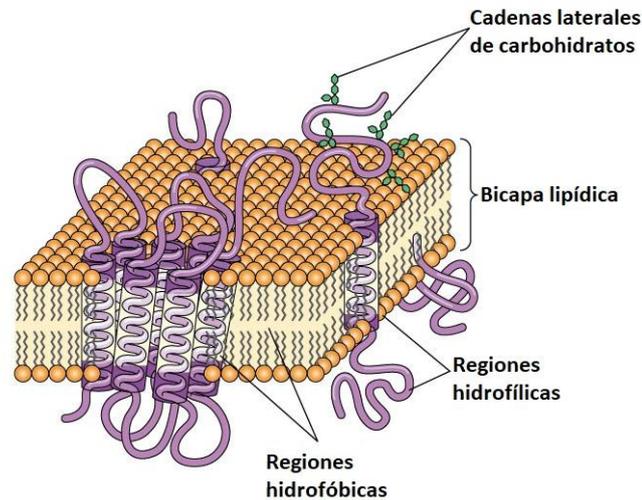


Figura 1.3. Estructura de la membrana citoplasmática (adaptada de Plopper, 2012).

Aunque todas las membranas son similares, la composición de ácidos grasos varía dentro del grupo de los procariontes. Por un lado, las bacterias Gram-negativas poseen básicamente ácidos grasos saturados, monoinsaturados y ácidos grasos con anillo de ciclopropano, mientras que, por otro lado, las bacterias Gram-positivas poseen elevadas proporciones de ácidos grasos saturados ramificados, con un grupo metilo en posición *iso* o *anteiso*, de ácidos grasos saturados de cadena recta, y una pequeña cantidad de ácidos grasos insaturados.

INTRODUCCIÓN

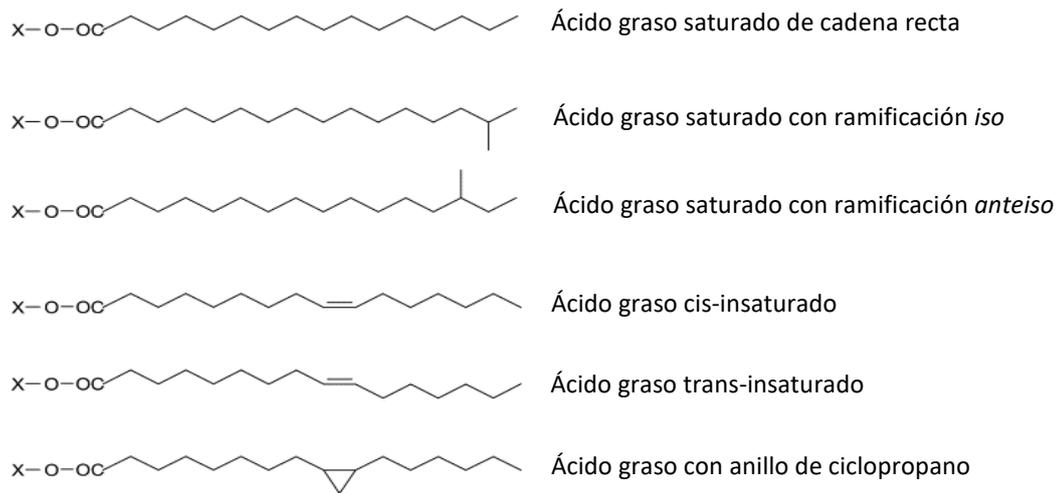


Figura 1.4. Estructura de los principales ácidos grasos presentes en la membrana citoplasmática de las células procariotas (Denich y col., 2003).

En esta membrana también se encuentran ciertas proteínas total o parcialmente embebidas entre los fosfolípidos. Las principales proteínas de membrana poseen una región altamente hidrofóbica que interacciona con las zonas apolares de las cadenas de ácidos grasos, y, por otro lado, las proteínas hidrofílicas y otras sustancias cargadas, como los iones metálicos, pueden fijarse a las superficies hidrofílicas. Por último, toda esta estructura se estabiliza mediante el establecimiento de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Además, cationes como el Mg^{2+} y el Ca^{2+} también contribuyen a su estabilización mediante interacciones iónicas con los grupos polares de carga negativa presentes en los fosfolípidos.

La membrana citoplasmática separa el interior celular del entorno que rodea a la célula y, al poseer una permeabilidad selectiva, permite la entrada de determinados compuestos y la salida de las sustancias de desecho. Para ello, la membrana incluye diferentes proteínas, llamadas proteínas de transporte de membrana, que actúan por transporte activo obteniendo la energía del ATP. Este mecanismo de transporte permite la entrada de moléculas cargadas como los ácidos orgánicos, aminoácidos y sales inorgánicas. Por el contrario, algunos compuestos pequeños no polares y las sustancias solubles en fases hidrofóbicas, como los ácidos grasos, alcoholes y benceno, son capaces de atravesar la membrana libremente sin necesidad de proteínas de transporte (Stanier y Villanueva, 1996; Madigan y col., 2009).

Otras funciones que presenta la membrana citoplasmática, y que son de gran importancia para el correcto funcionamiento de la célula, son:

- Actuar de barrera osmótica.
- Generar energía a través de la cadena de transporte de electrones.

- Colaborar de manera activa en el mantenimiento de la homeostasis celular.
- Ayudar en la síntesis de componentes de la propia membrana y de la pared celular.
- Participar en la división celular.
- Actuar como sensor frente a diversos estímulos externos.

En opinión de Mackey (2000) cualquier alteración de esta membrana, ya sea modificando su estructura o alterando sus propiedades físicas, podía dar lugar a la pérdida de una o varias de sus funciones reduciendo la capacidad de supervivencia celular.

- ADN

En las células bacterianas el ADN se presenta en forma de doble cadena. Cada una de ellas contiene varios millones de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster. Ambas cadenas se asocian entre sí mediante puentes de hidrógeno formados entre los nucleótidos de ambas cadenas, siendo la configuración más estable aquella que se forma por enlaces entre la guanina y la citosina, y entre la adenina y la timina. Es por ello que la unión entre las cadenas solo se produce cuando las bases de ambas son complementarias.

Esta estructura se puede presentar sola o asociada con ciertas proteínas, que pueden ser importantes en el mantenimiento de su estructura, al igual que los iones magnesio y las poliamidas. Normalmente esta estructura se encuentra superenrollada y recibe el nombre de nucleoide. A diferencia de las células eucariotas, el ADN no presenta una membrana que le separe del resto de componentes citoplasmáticos. Cada célula procariota contiene un único nucleoide que ocupa aproximadamente el 10% del volumen total de la célula y dentro de él se encuentran los genes que codifican las proteínas celulares y las especies estables del ARN. Asimismo, en gran parte de las células bacterianas existe también ADN extracromosómico en forma de plásmidos cuyos genes no son esenciales para el metabolismo y la multiplicación celular, pero sí en otros aspectos como la resistencia a antibióticos.

La integridad del ADN es imprescindible en la replicación celular y una vez destruido es irreparable, conduciendo a la muerte de la célula. El daño al ADN es la principal causa de muerte en células expuestas a algunos agentes estresantes, como son las radiaciones ionizantes o ultravioleta (Bintsis y col., 2000; Morikawa y col., 2006). Las radiaciones ionizantes causan diversas alteraciones en el ADN, siendo la más importante la rotura de una o de las dos hebras. En cuanto a la luz ultravioleta, cuando se aplica sobre las células, particularmente la que tiene una longitud de onda de entre 250 y 260 nm, es absorbida por los ácidos nucleicos,

INTRODUCCIÓN

produciendo un aumento de los dímeros de pirimidina tipo ciclobutano que distorsionan la hélice (Mackey, 2000). No obstante, en ambos tipos de radiación se considera que su modo de acción primordial es indirecto, a través de la generación de radicales libres de hidroxilo y otros ROS (del inglés, *Reactive Oxygen Species*) que afectarían a los componentes de la cadena de ADN (Dizdaroglu, 1992; Cabiscol y col., 2000; Imlay, 2015). Es decir, la resistencia intrínseca del ADN estaría asociada con la capacidad para protegerse frente al denominado “estrés oxidativo”. Algunos autores han descrito que el uso de eliminadores o neutralizadores de estos radicales contribuyen a la defensa celular frente al daño producido por estos agentes (Dizdaroglu, 1992; Mackey, 2000). Por ejemplo, ciertas enzimas que actúan frente a los ROS, tales como las superóxido dismutasas y las catalasas, o los sistemas glutatión y tioredoxina están implicados en la protección del ADN frente al estrés oxidativo (Imlay, 2013). Asimismo, durante los últimos años, diversos autores han relacionado una proteína de unión no específica al ADN conocida como Dps, presente en *E. coli*, con un papel protector del ADN frente al estrés oxidativo. Según diversos autores la proteína Dps secuestraría el ADN formando una red cristalina extensa tanto *in vitro* como *in vivo*, impidiendo de este modo el contacto de los radicales libres con el ADN (Wolf y col., 1999); y, además, secuestraría el hierro, ya que la estructura cristalina de esta proteína es un homólogo de la ferritina, impidiendo de este modo la presencia de hierro libre capaz de participar en la reacción de Fenton (Grant y col., 1998). Aunque esta proteína ha sido aislada únicamente en *E. coli*, se han descrito proteínas homólogas en otros microorganismos de interés, como es el caso de la proteína MrgA en *B. subtilis* y en *S. aureus* (Storz y Zheng, 2000; Morikawa y col., 2006).

Además el daño a esta estructura también se puede producir por otros agentes como son el tratamiento térmico, la congelación – descongelación, el secado o los tratamientos ácidos, entre otros.

- Ribosomas y ARN.

El ARN -ácido ribonucleico- es una única cadena que en determinadas circunstancias puede curvarse sobre sí misma originando la unión entre sus bases, lo que da lugar a una gran diversidad de conformaciones estructurales.

Los ribosomas constan de un complejo 70S, formado por dos subunidades (50S y 30S) que se unen durante la síntesis proteica, y que se separan cuando ésta cesa. Ambas subunidades están compuestas por proteínas y ARN. La subunidad pequeña, 30S, contiene el ARN 16S con 20 proteínas diferentes, mientras que la subunidad grande, 50S, contiene el ARN 23S con 30 proteínas. Los diversos componentes del ribosoma se encuentran unidos entre sí por puentes

de hidrógeno e interacciones iónicas e hidrofóbicas (Schmeing y Ramakrishnan, 2009). En este caso, como en el caso del ADN, los iones de magnesio también juegan un papel esencial en el mantenimiento de la estructura del ribosoma, siendo necesaria una concentración adecuada para evitar la pérdida de la estabilidad (Laing y col., 1994; Mackey, 2000). Esta pérdida de estabilidad y/o funcionalidad de los ribosomas podría deberse también a la disociación en subunidades, a la desnaturalización de las proteínas ribosomales o a la degradación del rARN, bien por la acción de los agentes aplicados o por la acción de las ribonucleasas (Mackey, 2000).

Por otro lado, la célula bacteriana regula la síntesis de ribosomas para acomodar su necesidad a la síntesis de proteína.

- Proteínas y enzimas específicos.

El último componente que podría ser considerado como una posible diana de los agentes usados en la conservación de los alimentos para lograr la inactivación microbiana son las proteínas. Las proteínas son de gran importancia en cuanto a la estructura celular y, además, algunas presentan actividad enzimática y, por lo tanto, son imprescindibles para cualquier función celular. Algunas de las funciones más importantes que presentan son:

- Mantenimiento de la homeóstasis celular.
- Generación de energía y otros compuestos.
- Eliminación de residuos.
- Participación en los procesos de replicación, transcripción y traducción.
- Participación en la reparación y protección de las diferentes macromoléculas.

Aunque el número de estas enzimas en el interior celular es muy elevado, a continuación solo se citarán algunas de especial relevancia.

- **ARN polimerasa**

Esta enzima se encarga de la transcripción, es decir, de la síntesis de la cadena de ARN mensajero a partir del ADN. Las células bacterianas, a diferencia de los otros grupos celulares, poseen un único tipo de ARN polimerasa, con una estructura cuaternaria sencilla. Esta ARN polimerasa contiene cuatro polipéptidos, α , β , β' y uno de los diferentes factores σ , combinados en una relación 2:1:1:1, respectivamente, en la polimerasa activa. La subunidad σ es la encargada del reconocimiento de las secuencias promotoras y se encuentra más débilmente unida al resto, que se conoce como "núcleo del enzima". Además, las células

INTRODUCCIÓN

bacterianas suelen poseer diferentes subunidades σ , que reconocen diferentes promotores, constituyendo una eficaz regulación de la expresión génica (Madigan y col., 2009).

Actualmente se ha descrito la importancia de la actividad de esta enzima en la supervivencia celular. Diferentes estreses como el estrés osmótico, el estrés térmico, el daño a la membrana, el daño al ADN o el daño oxidativo alteran la actividad de esta enzima y producen la expresión defectuosa de genes, la mutagénesis de genes específicos y la muerte celular (Lang y col., 2017). Por todo ello, este enzima constituye un componente crítico, ya que es esencial a todos los niveles celulares, y además necesario para su propia síntesis.

○ **Enzimas con acción antioxidante**

El mantenimiento de la homeostasis oxidativa es de gran importancia en la supervivencia microbiana. Para ello, es necesario el mantenimiento del equilibrio entre las sustancias prooxidantes y antioxidantes presentes en la célula (Storz y Zheng, 2000), ya que un elevado número de sustancias prooxidantes llevaría a la aparición de daños en proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. Por ello, las células presentan una serie de sistemas, enzimáticos y no enzimáticos, para neutralizar las diferentes especies oxidantes o reparar los daños causados por éstas.

Entre los sistemas enzimáticos cabría destacar las superóxido dismutasas (eliminadoras de radicales superóxido), las catalasas (eliminadoras de peróxido de hidrógeno y peróxido orgánico), las hidroperoxidasas (eliminadoras de peróxidos), y los enzimas de los sistemas glutatión y tiorredoxina (Imlay, 2013; Smirnova y col., 2016). Todos estos enzimas, aunque juegan un gran papel en la defensa celular, podrían no ser considerados componentes críticos, ya que aunque en cierta medida están relacionados con la pérdida de la viabilidad de las células, en muchos casos pueden ser resintetizados por la maquinaria celular. Sin embargo, debido a su importancia en el mantenimiento del equilibrio redox, se explicará su actividad y su función en la siguiente sección.

○ **Otras enzimas de interés**

Otros enzimas celulares que podrían considerarse de interés en la célula son, por ejemplo, la enzima ATPasa de membrana o enzimas que participan en las principales rutas metabólicas de la célula.

- La enzima ATPasa consta de un complejo enzimático compuesto por dos partes, una subunidad múltiple de cabeza en la parte interna de la membrana

citoplasmática y una cola que conduce los protones y que distiende la membrana. La función principal de esta enzima es catalizar una reacción reversible entre ATP y ADP + fosfato inorgánico. Para la formación de ATP, esta enzima permite la entrada de protones a través de la membrana en un proceso llamado fosforilación oxidativa. Además esta enzima puede llevar a cabo la reacción inversa, es decir, la hidrólisis de ATP y el bombeo de $4H^+$ al otro lado de la membrana. Sin embargo, esta actividad se puede ver alterada o inhibida por diferentes compuestos como pueden ser el dinitrofenol, el dicumarol y algunos ácidos, como el ácido sulfhídrico (Madigan y col., 2009). Además su actividad también puede ser inhibida por otros agentes que desnaturalizan las enzimas, como podría ser el tratamiento térmico (Roman y González Flecha, 2014).

- Enzimas que participan en las principales rutas metabólicas de la célula. Hay un amplio número de enzimas implicadas en las rutas metabólicas celulares, como puede ser en su respiración, en la obtención de energía o en otras rutas. Algunas de ellas serían, por ejemplo, enzimas implicadas en el ciclo de Krebs como la piruvato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa o α -cetoglutarato deshidrogenasa, entre otras.

Sin embargo, al igual que sucedía con las enzimas con actividad antioxidante, estas enzimas, aunque son de gran importancia para el buen funcionamiento celular, no se considerarían componentes críticos, ya que la célula puede sustituirlas por otros mecanismos que lleven a cabo las mismas funciones o similares, siempre que las condiciones medioambientales sean favorables.

1.2.1.1.2 Alteraciones en el mantenimiento de la homeóstasis: estrés oxidativo

La palabra homeostasis (del griego *homeo* que significa constante, y *stasis* que significa mantener) se ha utilizado para describir los mecanismos que mantienen constantes las condiciones del medio interno de un organismo, aún cuando se producen grandes oscilaciones en las condiciones del medio externo. Estos cambios en las condiciones externas obligan a las células a poner en marcha ciertos mecanismos que permitan mantener estable su medio intracelular, por lo que la homeostasis se ha convertido en uno de los conceptos más importantes en la fisiología microbiana. Algunos de los principales parámetros que las células deben mantener constantes en su citoplasma son:

- **pH interno.** El mantenimiento del pH interno constante permite que se lleven a cabo numerosas reacciones químicas necesarias para la vida de la célula, permitiendo así el mantenimiento de la estructura y el metabolismo celular, y, por lo tanto, el crecimiento y la multiplicación de las células.
- **Fuerza motriz del protón** (*proton motive force*) se define como la fuerza que promueve el movimiento de protones a través de una membrana biológica debido a un potencial electroquímico. Si hay mayor concentración de protones a un lado de la membrana, fluirán hacia la zona con menor concentración, es decir, en favor del gradiente electroquímico. Algunas proteínas de membrana son capaces de utilizar energía para crear un gradiente de protones entre los compartimentos celulares separados por la membrana asociada. Por el contrario, otras proteínas son capaces de aprovechar esta fuerza motriz para llevar a cabo sus funciones. Uno de los ejemplos más destacados es la cadena de transporte de electrones.
- **Presión osmótica.** La presión osmótica intracelular permite que el mantenimiento del nivel de agua y solutos intracelulares se mantenga constante, con el fin de que las células tengan los niveles necesarios de nutrientes para llevar a cabo sus funciones vitales.
- **Equilibrio oxidativo.** Se cree que el potencial redox es un importante factor selectivo en todos los ambientes, incluidos los alimentos, que probablemente influye en los tipos de microorganismos presentes y en su metabolismo. El potencial redox indica las relaciones de oxígeno de los microorganismos vivos y puede ser utilizado para especificar el ambiente en que un microorganismo es capaz de generar energía y sintetizar nuevas células sin recurrir al oxígeno molecular: los microorganismos aerobios requieren valores redox positivos y los anaerobios negativos. Además, cada tipo de microorganismo sólo puede vivir en un estrecho rango de valores redox. Por ello, el mantenimiento del equilibrio redox permite a la célula crecer y multiplicarse.

Dado su particular interés en esta Tesis, se va a describir más detalladamente el mantenimiento de la homeostasis oxidativa en las células bacterianas.

1.2.1.1.2.1 La evolución bacteriana y la aparición del término “estrés oxidativo”

Las células primitivas, anaerobias estrictas, vivían de la fermentación absorbiendo compuestos orgánicos y generando ATP (adenosintrifosfato) anaeróbicamente. En consecuencia, evolucionaron en ausencia de oxígeno (Camps, 2010). Sin embargo, a medida

que las reservas de compuestos orgánicos se fueron reduciendo con el tiempo, se produjo la evolución del aparato fotosintético, que permitió a las células manufacturar los compuestos orgánicos que necesitaban a partir de compuestos inorgánicos, utilizando la luz como fuente de energía. Sin embargo, los primeros fotosintetizadores fueron también las bacterias anaeróbicas y su primitiva forma de fotosíntesis no generaba oxígeno (Camps, 2010).

Las células fotosintéticas, derivadas de las anaerobias estrictas, desarrollaron un nuevo tipo de fotosíntesis que les permitió obtener el hidrógeno de las moléculas de agua eliminando oxígeno como producto residual; esto ocurrió hace unos 2500 millones de años con la proliferación de las cianobacterias (los primeros organismos que liberaron oxígeno como producto residual de la fotosíntesis). Así, el oxígeno comenzó gradualmente a acumularse en el agua, suelos, sedimentos y en la atmósfera: la era aeróbica estaba comenzando. El oxígeno es un gas tóxico y reactivo capaz de oxidar los compuestos del carbono. Al ser tóxico para la vida primitiva, se fue convirtiendo en un agente contaminante cada vez más peligroso, llegando a constituir una amenaza para su propio productor, las cianobacterias (Camps, 2010).

Muchos organismos, incapaces de tolerar este gas, tuvieron que refugiarse en nichos anaeróbicos, o se extinguieron. Por otro lado, la presencia creciente de oxígeno forzó, a otro grupo de células, a desarrollar mecanismos para su detoxificación intracelular, en los que se encuentran implicadas enzimas tales como catalasas, peroxidasas y superóxido dismutasas, que reaccionan con los radicales tóxicos producidos por el oxígeno y los convierten en compuestos orgánicos inocuos y agua. La evolución de estas enzimas protectoras permitió que las células toleraran la presencia de oxígeno.

Pronto los microorganismos comenzaron a utilizar el oxígeno, mediante la respiración. Esta solución no solo les protegió, sino que además les aportó una mayor cantidad de energía, ya que la respiración aerobia genera más ATP que la fermentación. Sin embargo, muchos de los productos que se originan durante la respiración celular son por naturaleza potentes oxidantes para otras moléculas, por lo que las células desarrollaron sistemas defensivos frente a las especies reactivas del oxígeno que se producen durante la respiración. De ahí derivó el término “estrés oxidativo” que ha sido definido como un desequilibrio entre las sustancias prooxidantes y las antioxidantes, en favor de las prooxidantes. Se considera que el metabolismo respiratorio de los diferentes microorganismos es el principal factor inductor de estrés oxidativo en las células (Farr y Kogoma, 1991).

Según el tipo de metabolismo respiratorio las bacterias se dividen en:

INTRODUCCIÓN

- ✓ Aerobias: requieren oxígeno.
- ✓ Anaerobias estrictas: no pueden crecer en presencia de oxígeno.
- ✓ Anaerobias facultativas: pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno.
- ✓ Microaerófilas: requieren muy baja concentración de oxígeno para su crecimiento.

Los microorganismos aerobios usan oxígeno molecular (O_2) durante su respiración y oxidación de los nutrientes con el fin de obtener energía. Durante el crecimiento aerobio de las células se producen continuamente una serie de productos, como son los radicales anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales hidroxilo (OH^{\bullet}), que son altamente reactivos. Muchos de estos productos derivan de una reducción secuencial del oxígeno molecular catalizada por diferentes enzimas de la cadena respiratoria asociada a la membrana. Estos radicales libres fueron descritos por primera vez por Moses Gomberg hace más de un siglo (Gomberg, 1900). Durante mucho tiempo no se consideró su presencia en los sistemas biológicos debido a su alta reactividad y, consecuentemente, a su corto periodo de vida. Sin embargo, 30 años más tarde, Leonor Michaelis propuso que todas las reacciones de oxidación que se producían en las moléculas orgánicas podrían ser mediadas por los radicales libres. Esa hipótesis consiguió aumentar el interés por los radicales libres en los procesos biológicos. En los años 50, los radicales libres fueron encontrados en los sistemas biológicos (Commoner y col., 1954) e, inmediatamente, se supuso que estaban envueltos en diversas patologías (Gerschman y col., 1954) y en el envejecimiento (Harman, 1956). Desde entonces, nuestro conocimiento en el papel de los radicales libres en los procesos de la vida se ha extendido enormemente.

Desde hace mucho tiempo hasta ahora, se ha considerado que juegan un papel principalmente perjudicial. Este punto de vista se ha visto reforzado tras el descubrimiento de McCord y Fridovich (1969), quienes describieron la primera enzima protectora contra los radicales libres llamada superóxido dismutasa. Además, actualmente se sabe con total claridad que los radicales libres son participantes activos en diversos procesos y que no se pueden considerar solo como agentes dañinos sino como componentes reales en muchas funciones normales de la vida de los organismos.

Por todo ello, y debido al gran interés que ha generado la presencia de estos radicales libres en los organismos vivos, se ha incrementado el número de estudios dedicados a descubrir cuál es el papel que juegan estos radicales, su modo de actuación y las consecuencias que derivan de su presencia en los organismos vivos.

El campo de la investigación sobre los radicales libres, o más comúnmente llamados especies reactivas, en los sistemas biológicos es uno de los más dinámicos, pero también uno de los más complicados debido a diversas razones (Halliwell y Gutteridge, 2015):

- Su baja estabilidad y su elevada reactividad resultando en una concentración cambiante.
- La alta diversidad de reacciones en las que pueden participar.
- La complicada distribución espacio-temporal tanto dentro como fuera de las células.
- La dependencia del estado fisiológico de los organismos.
- La ausencia de técnicas adecuadas para una evaluación fiable de sus niveles totales e incluso de sus niveles relativos.

1.2.1.1.2.2 Generación, control y eliminación de los radicales libres en los organismos

La **generación** de los radicales libres se debe a un desequilibrio entre la producción de oxidantes y su degradación. Este desequilibrio ha sido llamado por numerosos autores como “estrés oxidativo” (Storz y Zheng, 2000; Sorg, 2004; Imlay, 2015). El estrés oxidativo es producido debido a la presencia de oxígeno, por lo que en los microorganismos anaerobios estrictos no se ha observado hasta el momento.

En los organismos vivos que se encuentran bajo condiciones aerobias más de un 90% de oxígeno es transformado directamente en agua por la citocromo oxidasa de la cadena de transporte de electrones (CTE), que se encuentra en la membrana citoplasmática de las células procariontas y en la membrana mitocondrial interna de las eucariotas, mediante el mecanismo de cuatro electrones sin la liberación de ROS. Menos del 10% restante de oxígeno es reducido mediante rutas sucesivas de adición de un electrón produciendo la conversión del oxígeno molecular en radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), seguido de la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y, por último, a partir de éste se produce la formación de radicales hidroxilo (OH^{\bullet}) (Figura 1.5) (Farr y Kogoma, 1991; Imlay, 2003; Lushchak, 2014). Aunque el peróxido de hidrógeno no es por sí mismo un radical libre, está incluido dentro del grupo de ROS debido a que es químicamente más activo que el oxígeno molecular. Además, en presencia de catalizadores como el hierro y el cobre, mediante las reacciones de Haber-Weiss o Fenton, da lugar a la formación de radicales hidroxilo.

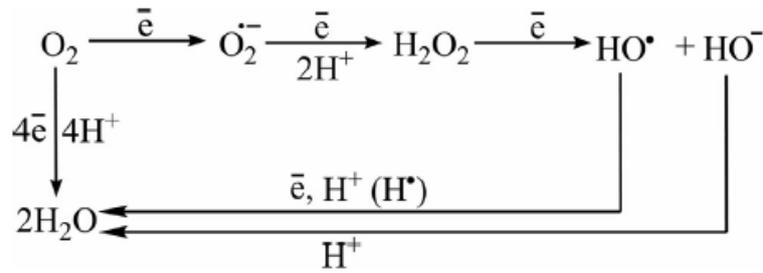


Figura 1.5. Reducción del oxígeno molecular mediante el mecanismo de cuatro electrones y de un electrón (Lushchak, 2014).

La generación de especies reactivas del oxígeno, además de producirse debido al crecimiento de las células en unas condiciones ambientales que contengan oxígeno, también puede tener lugar por otras vías, aunque siempre en presencia de oxígeno. Por ejemplo, se ha visto que, *in vitro*, se forman por la autooxidación de las deshidrogenasas durante la respiración. La formación de estos radicales a partir de la oxidación de las enzimas depende directamente de la frecuencia de colisión de las mismas con el oxígeno, por lo que depende de la concentración de oxígeno (Imlay, 2003). Además, hay que tener en cuenta que el mecanismo exacto de generación de estas ROS no se conoce, que es diferente entre microorganismos aunque se encuentren en las mismas condiciones ambientales, ya que la tolerancia al oxígeno varía entre especies, y que puede variar incluso en un mismo microorganismo dependiendo de las condiciones en las que se encuentre y de los cambios que se produzcan en sus enzimas más autooxidables.

En los últimos años, el interés de los investigadores está dirigiéndose también a las especies reactivas del nitrógeno (RNS), que presentan un papel importante reconocido en eucariotas (Elfering y col., 2002). No obstante, es importante tener en mente que ambos tipos de radicales, ROS y RNS, se pueden producir en las células procariontas, dependiendo de su metabolismo y condiciones medioambientales (Corker y Poole, 2003). Por ejemplo, se ha descrito que en las células de *E. coli* se produce NO, óxido nítrico, en condiciones de anaerobiosis, a partir de nitrito. Aunque se está comenzando a estudiar su posible rol en procariontas, esta Tesis Doctoral se ha centrado en los radicales derivados del oxígeno, dado su mayor nivel de conocimiento actual.

Con el objetivo de profundizar más en el proceso de generación de especies reactivas del oxígeno a continuación se detallan diversas fuentes de generación de estrés oxidativo.

Las especies reactivas del oxígeno son producidas por una variedad de compuestos y enzimas. La reducción de los cuatro electrones desde el O₂ hasta el H₂O se produce de manera secuencial, como ya se ha visto anteriormente, y estas reacciones se llevan a cabo mediante

enzimas de la cadena respiratoria asociada a la membrana (Farr y Kogoma, 1991). Sin embargo diversos autores han descrito diferentes fuentes de generación de cada una de las especies reactivas del oxígeno.

1. Generación de radicales superóxido:

Imlay y Fridovich (1991) demostraron que la autooxidación de la NADH deshidrogenasa, de la succinato deshidrogenasa y de la D-lactato deshidrogenasa son las mayores fuentes de $O_2^{\bullet-}$ en *E. coli*. Además, una enzima citosólica capaz de generar cantidades significativas de $O_2^{\bullet-}$ es la glutatión reductasa, que usa NADH como fuente para obtener un electrón. Por otro lado, la producción no enzimática de $O_2^{\bullet-}$ ocurre por autooxidación de muchos componentes celulares incluyendo ubiquinoles, catecoles, tioles y flavinas (Imlay, 2013). En este caso, a diferencia de otros radicales, como el peróxido de hidrógeno, los radicales superóxido, al estar cargados, no pueden penetrar a través de la membrana celular, lo que indicaría que los radicales superóxido detectados dentro de las células provendrían de la misma célula y no del exterior. Sin embargo, las bacterias pueden excretar compuestos orgánicos derivados del ciclo redox que pueden pasivamente entrar en el interior de las células objetivo. Estos compuestos pueden extraer electrones de los centros metálicos de bajo potencial, de las quinonas y de las flavinas y luego pueden transferir estos electrones al oxígeno generando $O_2^{\bullet-}$.

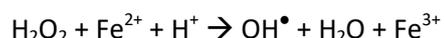
2. Generación de peróxido de hidrógeno:

La enzima superóxido dismutasa cataliza el paso de los radicales superóxido a peróxido de hidrógeno, siendo esta reacción la principal fuente de generación de estos radicales. Esta reacción también es llevada a cabo por otros enzimas como la D-aminoácido oxidasa. Sin embargo, el peróxido de hidrógeno no solo se puede formar intracelularmente sino que puede provenir del ambiente que rodea a las células. El peróxido de hidrógeno ambiental proviene de varias fuentes: la oxidación de sulfuros y metales reducidos, la formación fotoquímica de oxidantes por medio de flavinas u otros cromóforos, la excreción de este compuesto por bacterias ácido lácticas que contienen lactato y piruvato oxidasas, etc. Además, el H_2O_2 exterior puede cruzar las membranas celulares gracias a su pequeño tamaño y a su carga neutra, por lo que las células no solo tienen que regular la generación en su interior sino que tienen también que lidiar con la concentración de este compuesto que reciben del exterior (Imlay, 2013).

INTRODUCCIÓN

3. Generación de radicales hidroxilo:

Las fuentes de radicales hidroxilo son numerosas. Por ejemplo, la oxidación por radiólisis de los residuos de triptófano presentes en las proteínas intracelulares generan estos radicales, también la radiólisis del agua los produce, y otra fuente significativa es la reacción de Fenton, en la cual el peróxido de hidrógeno reacciona con hierro reducido generando radicales hidroxilo (Farr y Kogoma, 1991). Para que esta reacción se lleve a cabo, ciertos metales de transición activos en el ciclo redox (Cu, Cr, Co, V y, en menor medida, Ni) reaccionan con el Fe catalizando la reacción de Fenton, de acuerdo a la siguiente reacción:



Se ha observado que el cobre también cataliza la formación de radicales hidroxilo “*in vivo*”, y algunos de los otros metales podrían hacer lo mismo (Lemire y col., 2013).

Como se ha discutido anteriormente, las especies reactivas del oxígeno se producen en aquellas células con respiración aerobia, surgiendo de una variedad de fuentes intracelulares y extracelulares. No es sorprendente, por lo tanto, que las células mantengan una fuerte defensa contra esta amenaza. El **control** del nivel de ROS no sólo se realiza mediante el control de su producción, sino también eliminándolos. Los organismos vivos poseen un complicado sistema antioxidante a diferentes niveles que ayuda a eliminar los ROS o a minimizar sus efectos negativos.

Algunos sistemas de defensa presentes en algunos microorganismos, como es el caso de *E. coli*, son:

- Enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa o la alquil-hidroperoxidasa. *E. coli* presenta tres SODs, una de ellas contiene manganeso (SOD-Mn), la cual es codificada por el gen *sodA*, otra contiene hierro (SOD-Fe), la cual es codificada por el gen *sodB*, y por último, presenta una enzima SOD cofactora del Cu-Zn periplásmico (Cu-Zn-SOD) que solo se sintetiza cuando las células entran en fase estacionaria y que es codificada por el gen *sodC*. El papel de estas enzimas consiste en la eliminación de radicales superóxido dentro de las células, mediante su conversión a peróxido de hidrógeno. Además, *E. coli* contiene dos enzimas catalasa: la catalasa HPI codificada por el gen *katG* y la catalasa HP II codificada por el gen *katE*, las cuales convierten el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Por último, *E. coli* también posee la enzima alquil-hidroperoxidasa reductasa (Ahp) codificada por los genes *ahpC* y *ahpF*, que proporcionaría a las células una defensa adicional ayudando a reducir varios hidroperóxidos orgánicos (Farr y Kogoma, 1991; Chiang y Schellhorn, 2012).

- Enzimas como la glutatión peroxidasa (GPX) que reduce el peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos orgánicos (R-OOH) (Crawford y Davies, 1994; Sorg, 2004).
- Enzimas endonucleasas y exonucleasas. Estas enzimas ayudan a la reparación del ADN, que puede ser dañado, como se ha descrito anteriormente, debido a la presencia de especies reactivas del oxígeno. Para la reparación del ADN en primer lugar se ponen en marcha las enzimas endonucleasa IV y VIII, que inician la excisión de las bases oxidadas. Posteriormente, la exonucleasa III y la endonucleasa IV llevan a cabo la reconstrucción del ADN (Imlay, 2013).
- Sistemas glutarredoxina y tiorredoxina, que actúan reduciendo grupos tioles en proteínas oxidadas a través de mecanismos de intercambio tiol-disulfuro. Como muestra la figura 1.6. la glutarredoxina y la tiorredoxina ayudan a reducir los grupos tioles en proteínas oxidadas a través de mecanismos de intercambio tiol-disulfuro a expensas del NADPH, que pasa a su estado oxidado NADP⁺. La glutarredoxina es oxidada al reducir estos grupos tioles y vuelve a su estado reducido mediante la oxidación del glutatión, que vuelve a su estado reducido gracias a la acción de la glutatión reductasa. En cambio la tiorredoxina, tras ser oxidada para poder reducir los grupos tioles, vuelve a su estado reducido mediante la acción de la tiorredoxina reductasa. En ambos casos, el NADPH es regenerado gracias a la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.



Figura 1.6. Reducción de los puentes disulfuro mediante los sistemas glutarredoxina y tiorredoxina (Carmel-Harel y Storz, 2000).

Algunos autores han descrito que el estrés oxidativo puede conducir a daños en el ADN y mutaciones, peroxidación lipídica, desnaturalización de clusters hierro-azufre, formación de enlaces disulfuro, y otro tipo de oxidación de proteínas. Dados los requerimientos de glutatión y tiorredoxina necesarios para la reducción del enlace disulfuro y para las actividades de las peroxidasa dependientes de glutatión y tiorredoxina, así como el hecho de que el glutatión es el principal tiol celular, se han propuesto los sistemas basados en el glutatión y tiorredoxina como esenciales para la protección de las células contra el estrés oxidativo (Carmel-Harel y Storz, 2000).

Además, el glutatión es considerado de gran interés en la defensa celular frente al estrés oxidativo debido a su gran poder antioxidante (Crawford y Davies, 1994). Este compuesto se encuentra presente en elevadas concentraciones en todas las células eucariotas, sin embargo, dentro del grupo de las procarionotas se encuentra en las bacterias Gram-negativas, pero no en

INTRODUCCIÓN

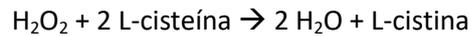
las Gram-positivas. De manera excepcional, algunas bacterias Gram-positivas pueden sintetizar glutatión u obtenerlo a partir del medio de crecimiento (*Streptococcus*, *Listeria*, *Enterococcus*). También se han encontrado análogos del glutatión en otros géneros Gram-positivos (Fahey, 2013). El glutatión es considerado el antioxidante natural más potente, siendo, por lo tanto, un buen instrumento para la defensa celular. Este poder antioxidante es debido a la capacidad del glutatión para oxidarse, mediante la donación de un electrón. Posteriormente, este glutatión oxidado es reducido, mediante la glutatión reductasa, volviendo de nuevo a su forma inicial (GSH) (Smirnova y Oktyabrsky, 2005). Se piensa que el glutatión podría jugar un papel crítico en la protección frente a estreses medioambientales como el shock osmótico, la acidez, la presencia de toxinas o diversos compuestos como el ácido hipocloroso o la monocloramina y el estrés oxidativo (Masip y col., 2006).

- Proteínas de unión al ADN con actividad de fijación de hierro: Dps y MrgA. Como ya se ha descrito anteriormente, durante los últimos años la proteína de unión no específica al ADN conocida como Dps o MrgA, según el microorganismo, presenta un papel protector del ADN frente al estrés oxidativo (Martinez y Kolter, 1997; Storz y Zheng, 2000). Su modo de acción consistiría en la formación de una red cristalina alrededor del ADN impidiendo que los radicales libres entren en contacto con esta estructura (Wolf y col., 1999) y, además, el secuestro del hierro por parte de esta proteína evitaría su presencia en forma libre alrededor del ADN, disminuyendo, de este modo, su participación en la reacción de Fenton (Grant y col., 1998).

- Además, las condiciones medioambientales pueden ejercer una notable influencia en el equilibrio redox celular. Además de los compuestos con actividad antioxidante, como serían el glutatión o el ascorbato, la presencia de ciertos compuestos con actividad quelante o reductora también podrían contribuir a la defensa celular frente al estrés oxidativo. Algunos de estos compuestos ya han sido descritos en la bibliografía, como sería el caso de:

- La **L-cisteína**, es un compuesto que reduce el potencial redox y secuestra el hierro intracelular dificultando de esta manera la reacción de Fenton (Barford, 2004; Aertsen y col., 2005). Además, durante los últimos años, se ha considerado su papel como precursor de la síntesis del glutatión, ya que la síntesis de GSH dependería de la biodisponibilidad de L-cisteína, y se vería estimulada por la adición de cisteína al medio (Smirnova y Oktyabrsky, 2005). Sin embargo, otros autores han descrito efectos negativos de este compuesto en las células, incluso a muy bajas concentraciones, por lo que este compuesto parece ejercer efectos contrapuestos en las células bacterianas. Por ejemplo, Park y Imlay (2003) describieron un papel reductor de la cisteína, que al reducir el hierro libre intracelular promovía la reacción de Fenton y provocaba daños oxidativos

al ADN celular. Otro ejemplo sería el descrito por Ohtsu y col. (2010), quienes describieron un efecto tóxico de este compuesto, debido a que provocaba la inhibición de diferentes enzimas como la treonina deaminasa, enzima necesaria para la síntesis de L-isoleucina, y también describieron un efecto protector de la cisteína ya que, el sistema cisteína/cistina tendría efectos detoxificantes de H₂O₂ en el periplasma celular de *E. coli*. La cisteína puede reaccionar con H₂O₂ y dar lugar a H₂O mediante la siguiente reacción:



- El **manitol y la tiourea** son dos compuestos quelantes de los radicales hidroxilo, disminuyendo así su toxicidad. El manitol es un azúcar alcohol o polialcohol producido por la mayoría de los microorganismos, incluyendo bacterias, levaduras y hongos. Durante los últimos años se ha asumido que este compuesto tiene muchos efectos beneficiosos para los microorganismos, y uno de ellos es la protección frente al estrés oxidativo debido a su poder antioxidante y a su capacidad de quelar radicales hidroxilo (Wisselink y col., 2002). Por otro lado, la tiourea, junto con la dimetiltiourea, ha sido considerada de gran importancia debido a su capacidad para quelar radicales hidroxilo producidos en el interior celular, ya sea vía reacción de Fenton o por oxidación de otros compuestos (Whiteman y Halliwell, 1997). Sin embargo, su forma de quelar estos radicales no es directa como en el caso del manitol. La tiourea es un inhibidor de la xantina oxidasa, enzima capaz de producir especies reactivas del oxígeno (Halliwell, 1978), reacciona directamente con los radicales superóxido y el peróxido de hidrógeno (Kelner y col., 1990) y puede quelar iones metálicos capaces de catalizar la producción de radicales hidroxilo (Fox, 1984).

- El **tirón** (1,2-dihidroxibenzeno-3,5-disulfonato) es utilizado habitualmente como quelante de radicales superóxido, permitiendo su eliminación y, por lo tanto, evitando la aparición posterior de otros ROS derivados del mismo. Además, este compuesto es capaz de quelar gran variedad de iones metálicos impidiendo, de este modo, su participación en reacciones de oxidación (Krishna y col., 1992).

- El **piruvato de sodio** presenta propiedades antioxidantes debido a su capacidad para neutralizar directamente peróxidos y peroxinitritos. Por ello, se considera de gran interés su papel quelante de peróxido de hidrógeno (Wang y col., 2007). También se ha observado que su adición en los medios de recuperación ayuda a la eliminación de peróxido producido por el autoclavado, por lo que en algunos laboratorios se añade de forma rutinaria (Mackey y Seymour, 1987).

- El **2,2'-Dipiridil** tiene como principal función quelar el hierro intracelular. Este compuesto es altamente permeable, por lo que penetra en el interior celular, quela el

INTRODUCCIÓN

hierro libre y dificulta su uso en la reacción de Fenton, disminuyendo así el estrés oxidativo producido en la célula y aumentando, de esta manera, su probabilidad de supervivencia (Yan y col., 2013).

1.2.1.1.2.3 Reacciones y daños causados en las células

Los **radicales superóxido** oxidan los grupos tioles, el ascorbato, el tocoferol y las catecolaminas, entre otros compuestos. Además, las proteínas que contienen grupos (Fe-S)₄ son altamente sensibles al ataque por radicales superóxido. Sin embargo, probablemente las reacciones más importantes de estos radicales son su conversión a peróxido de hidrógeno y oxígeno y su capacidad para reducir los metales de transición y los metales complejos. Por otro lado, cuando el radical superóxido es protonado se produce el radical hidroperóxido (HOO[•]), que es más reactivo que el radical hidroxilo ya que la carga negativa ha sido neutralizada (Far y Kogoma, 1991). Además, estos radicales producen numerosas mutaciones en el ADN y cambios en la estructura de los aminoácidos, por lo que resultan tóxicos para las células por su capacidad para reaccionar con las proteínas y los ácidos nucleicos. Por último, evidencias indirectas parecen indicar que en *E. coli* las membranas también pueden ser dañadas por oxidantes (Imlay, 2003).

Las reacciones del **peróxido de hidrógeno** con moléculas orgánicas no están claras, en parte porque reacciona rápidamente con metales contaminantes para formar especies reactivas, que enmascaran su propio papel en las reacciones de oxidación. Sin embargo, se sabe que actúa como un agente oxidante débil, ataca a los grupos tiol de las proteínas y, también, reduce el glutatión (Imlay, 2003).

Las reacciones de los **radicales hidroxilo** son numerosas ya son tan reactivos que reaccionan con la mayoría de las biomoléculas del interior celular (Far y Kogoma, 1991). Algunos autores han descrito que estos radicales podrían estar vinculados con la carbonilación de las proteínas y la peroxidación de los lípidos de la membrana. Sin embargo, el mayor impacto que producen es el daño al ADN, donde pueden producir lesiones mutagénicas y/o letales en las células (Imlay, 2003).

Dada su alta reactividad, se han descrito diferentes efectos negativos en las estructuras celulares causados por la presencia de radicales libres. A continuación se detallan algunos de los más importantes:

- Daño al **ADN**. Las especies reactivas atacan tanto a las bases como a los azúcares produciendo roturas en las cadenas simples o dobles, generando lesiones que bloquean la replicación y otras funciones (Sies, 1993; Park y col., 2005). Además, hay

evidencias de que se producen daños oxidativos en el ADN durante el crecimiento aerobio cuando la capacidad de detoxificación de las células se ve comprometida (Storz y col., 1990). Imlay (2013) describió la mutagénesis como el impacto más importante producido por el estrés oxidativo. Sin embargo, aunque ni el peróxido de hidrógeno ni los radicales superóxido podían dañar el ADN directamente, sí que se observó un amplio grado de mutación en aquellas cepas carentes de los genes encargados de la activación de las enzimas SOD y catalasa/peroxidasa. El modo de acción de estos radicales podría deberse a su reacción con otros compuestos que se encuentran en contacto con el ADN. Por ejemplo, el H_2O_2 reaccionaría con el hierro asociado al ADN produciendo radicales hidroxilo que oxidarían las bases y producirían una amplia variedad de lesiones en el ADN. Por otro lado, debido a que el hierro es un compuesto importante en la reacción de Fenton, el ratio de daño al DNA es elevado cuando los niveles de hierro son altos. Por esta razón, en células deletéreas en algún gen *sod* o células deletéreas en el gen *fur*, todas ellas capaces de sobresintetizar hierro, se producirían un elevado efecto negativo sobre el ADN.

- Daño a las **proteínas**. La oxidación de proteínas ha sido menos caracterizada, aunque se han observado diferentes clases de daños como son oxidación de grupos sulfhidrilo, reducción de los disulfuros, reacción con aldehídos, fragmentación de péptidos, etc. Todas estas modificaciones se considerarían perjudiciales para la célula, ya que conducirían a una pérdida de función de las membranas y proteínas y bloquearían la replicación del ADN (Fucci y col., 1983; Cabisco y col., 2000). Según Cabisco y col. (2000), la oxidación irreversible de los aminoácidos presentes en una proteína podría producirse por dos mecanismos principales: la radiación ionizante y las reacciones de oxidación catalizadas por iones metálicos. Los efectos de la radiación ionizante en las proteínas serían atribuibles a los radicales hidroxilo formados por la radiólisis del agua que producirían la escisión del enlace peptídico. En cuanto a las reacciones de oxidación catalizadas por iones metálicos, según Farber y Levine (1986) y Stadtman (1993), algunos cationes del ciclo redox (como Fe^{2+} o Fe^{3+}) son capaces de unirse a un sitio específico de unión de metales de la proteína. Estas reacciones generan especies reactivas del oxígeno que pueden oxidar aminoácidos u otras proteínas cercanas. Muchas proteínas pueden modificarse tanto *in vitro* como *in vivo* por cualquiera de los sistemas de oxidación catalizados por iones metálicos, ya sean enzimáticos o no enzimáticos. Estos autores describieron algunas de las principales modificaciones observadas en las proteínas. Por ejemplo, pérdida de la actividad catalítica, modificación de ciertos aminoácidos, formación de grupos carbonilo, aumento de la

acidez, disminución de la estabilidad térmica, cambio en la viscosidad, cambio en la fluorescencia, formación de enlaces cruzados proteína-proteína, formación de puentes disulfuro y mayor susceptibilidad a la proteólisis. Actualmente, según Dahl y col. (2015), se considera que un 70% de las moléculas oxidadas en las células que sufren estrés oxidativo son de naturaleza proteica, indicando, por lo tanto, que las proteínas son dianas celulares importantes durante este estrés. Las especies reactivas del oxígeno causan numerosas modificaciones en las proteínas, incluyendo las nombradas anteriormente. Sin embargo, las proteínas diana más vulnerables son aquellas que contienen residuos de metionina y cisteína, debido a la presencia de grupos tiol. Esta oxidación podría conllevar la desestabilización, agregación o, incluso degradación de las proteínas.

- Daño a los **lípidos**. Los radicales libres actúan directamente sobre los ácidos grasos poliinsaturados en la membrana e inician la peroxidación lipídica, lo que disminuye la fluidez de la membrana, alterando sus propiedades y las de las proteínas que se encuentran unidas a la membrana. Este efecto actúa como un amplificador, se forman más radicales libres que reaccionan con los ácidos grasos poliinsaturados, lo cuales son degradados a una amplia variedad de productos. Algunos de ellos, como los aldehídos, son muy reactivos y pueden dañar otras moléculas como las proteínas. A diferencia de los radicales libres, los aldehídos son compuestos de larga duración y, por lo tanto, pueden difundir desde su sitio de origen hasta alcanzar y atacar otros objetivos, actuando como “segundos mensajeros tóxicos”. Entre los muchos aldehídos diferentes que se pueden formar durante la peroxidación lipídica, los más intensamente estudiados son el malonaldehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (HNE) (Humphries y Szweda, 1998; Cabisco y col., 2000). Por otro lado, otros autores han postulado que, aunque la peroxidación lipídica es un resultado universal del estrés oxidativo en células eucariotas, su aparición es menos probable en la mayoría de las bacterias. Esto es debido a que, para que se produzca esta peroxidación, como ya se ha dicho anteriormente, es necesaria la presencia de ácidos grasos poliinsaturados y la mayoría de los lípidos presentes en las bacterias contienen solo ácidos grasos saturados o monoinsaturados. Solo algunos estudios han presentado evidencias que podrían indicar la aparición de peroxidación de los lípidos de las membranas en las bacterias, pero estos datos deberían ser verificados para considerarlos consistentes (Imlay, 2013).

1.2.1.2 Aspectos particulares de los esporos bacterianos

Las bacterias disponen de muchas estrategias para sobrevivir a los cambios ambientales. Estas estrategias con frecuencia involucran cambios rápidos en la expresión genética que alteran temporalmente el fenotipo de una célula para permitir que sobreviva. Sin embargo, un ejemplo más sofisticado y prolongado de respuesta al estrés es la formación de **esporos** – esporulación-, en la que el genoma bacteriano está secuestrado en un lugar seguro, el esporo, hasta que las condiciones ambientales mejoren (Smelt y Brul, 2014). Los esporos representan el estado latente de un ciclo de vida bacteriano del tipo: célula vegetativa → esporo → célula vegetativa. Este ciclo biológico de los esporulados comprende por un lado, el crecimiento vegetativo, que es similar al resto de especies bacterianas, y, por otro lado, los procesos de esporulación y germinación.

La mayoría de las especies de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* pueden formar esporos cuando el medioambiente no facilita o permite el crecimiento. Durante el proceso de esporulación se producen cambios profundos en la composición y estructura celular, entre los que destacan la deshidratación del protoplasto, la síntesis de proteínas compactadoras del ADN y de algunos componentes especiales como el DPA (ácido dipicolínico), y el desarrollo de diversas envolturas protectoras. Estos cambios son responsables de la gran tolerancia de los esporos a las condiciones medioambientales adversas. Los esporos se forman dentro de la célula madre y salen al exterior cuando ésta se lisa. Debido a su baja o nula actividad metabólica, los esporos se consideran inactivos, aunque justo después de su formación tienen un breve periodo en el que muestran cierta actividad. Por otro lado, cuando estos esporos se encuentran en unas condiciones óptimas para el crecimiento celular vuelven a su forma vegetativa por medio de un proceso conocido como germinación.

1.2.1.2.1.1 La esporulación y sus factores de transcripción

La **esporulación** comienza cuando las células, en fase estacionaria, se quedan sin los nutrientes necesarios para su crecimiento y división. Sin embargo, la señal molecular última de la esporulación, si es que existe, todavía se desconoce. La esporulación es desencadenada por la fosforilación del regulador de la esporulación, el factor de transcripción Spo0A. Este factor de transcripción controla una gran cantidad de genes, incluidos los involucrados en la división celular asimétrica y los involucrados en la activación de los factores sigma específicos de la esporulación. La división asimétrica de la célula esporulante crea un esporangio compuesto por dos compartimentos, la célula madre y el preesporo, que en última estancia se convertirá

INTRODUCCIÓN

en el esporo. La división asimétrica del esporangio se produce por la acción de la proteína FtsZ. Esta proteína se dispone en forma de anillos Z que migran hacia los polos de la célula. Uno de ellos se desintegra, mientras que el otro forma un tabique o *septum* dividiendo el esporangio en dos partes desiguales, la célula madre y el preesporo. Además, el esporangio dispone inicialmente de dos cromosomas iguales, que posteriormente se separarán de modo que cada una de las células formadas retenga un cromosoma completo (Figura 1.7).

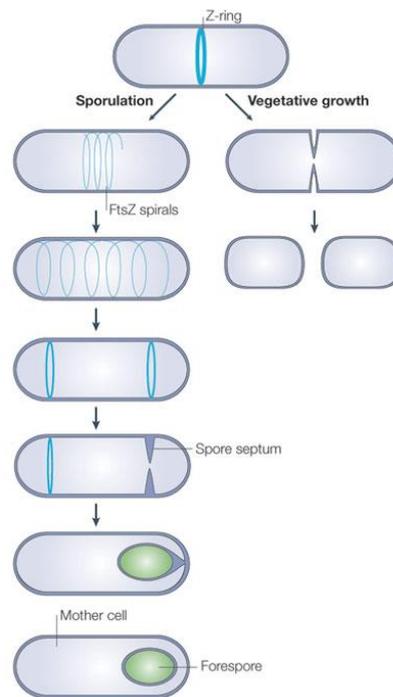


Figura 1.7. Relación entre los anillos Z y la formación del tabique en las células esporulantes (Rothfield y col., 2006).

La siguiente fase del desarrollo conlleva la endocitosis del preesporo, convirtiéndolo en una célula independiente en su interior que posteriormente madurará hasta transformarse en un esporo. Esta fase requiere de tres procesos principales: la formación alrededor del preesporo de las membranas interna y externa, la generación de una capa gruesa de peptidoglicano, conocida como corteza o *cortex*, situada entre ambas membranas, y la disposición de una cubierta proteica en la superficie que actúa como la primera barrera de protección del esporo.

Durante la siguiente etapa, la célula madre sintetiza el ácido piridina-2,6-dicarboxílico (ácido dipicolínico o DPA, *dipicolinic acid*) que se acumula en el preesporo produciéndose simultáneamente una reducción de su contenido en agua. La maduración del esporo se lleva a cabo durante esta etapa, y se caracteriza por un aumento en la densidad de la capa externa del esporo. Por último, se produce la lisis de la célula madre y la liberación al exterior del

esporo maduro. Las estructuras del esporo maduro protegen a los microorganismos inactivos de las condiciones desfavorables externas hasta que se vuelven favorables para el crecimiento celular vegetativo. El esporo latente es entonces reactivado y se produce la germinación y la división celular (Figura 1.8) (McKenney y col., 2013).

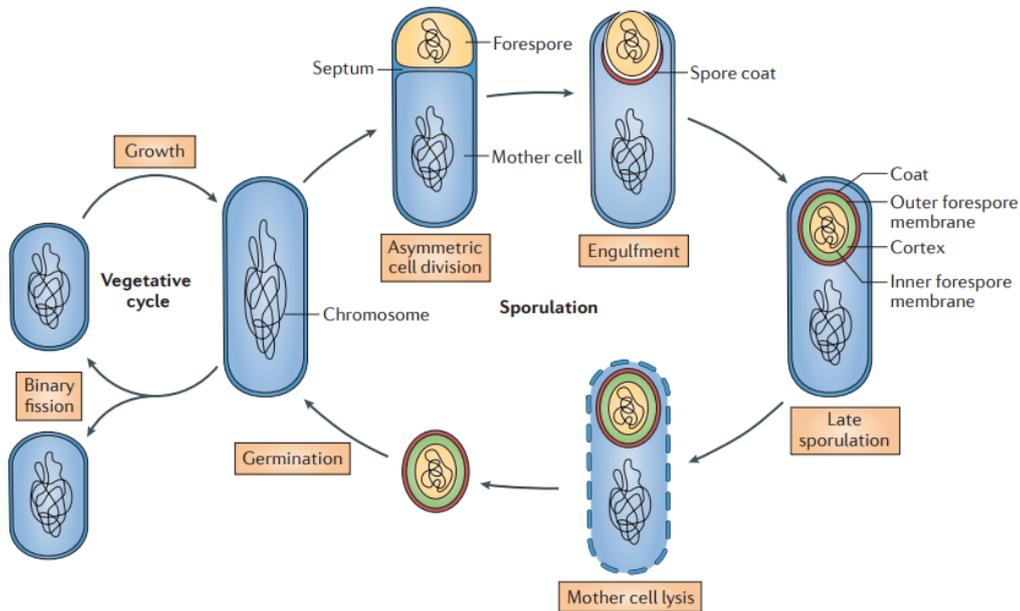


Figura 1.8. Ciclo de esporulación y germinación de *Bacillus subtilis* (McKenney y col., 2013).

1.2.1.2.1.2 Estructura del esporo

La resistencia y latencia de los esporos se debe a sus componentes y a su estructura única. Así, los esporos presentan varias capas que no se encuentran en las células en crecimiento (Figura 1.9):

1. Exosporio (*Exosporium*)
2. Interespacio (*Interspace*)
3. Capa externa (*Coat*)
4. Membrana externa (*Outer membrane*)
5. Corteza (*Cortex*)
6. Pared de la célula germinante (*Germ cell wall*)
7. Membrana interna (*Inner membrane*)
8. Protoplasto (*Core*)

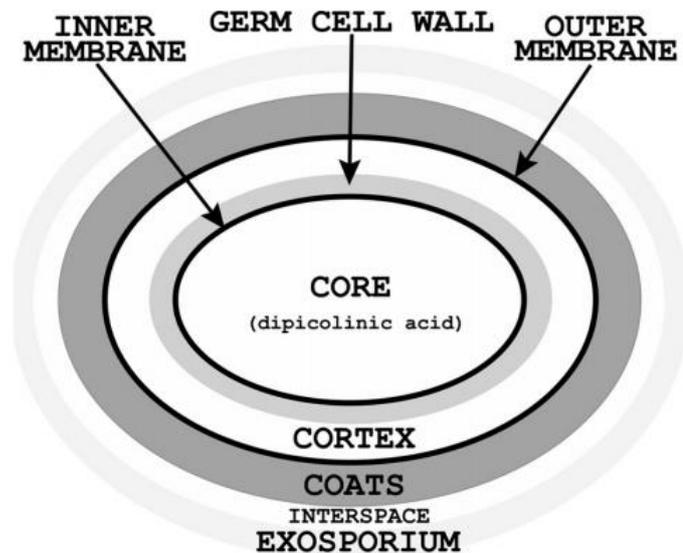


Figura 1.9. Estructura del espora (Setlow, 2014).

La capa más externa, denominada **exosporio** o *exosporium*, desempeña un papel clave en la resistencia de los esporos a productos químicos (Setlow, 2014). El exosporio se encuentra en determinadas especies del género *Bacillus*, estando especialmente desarrollada en *B. cereus*. Se compone de proteínas, incluyendo glicoproteínas exclusivas de esta estructura. En el caso de *B. subtilis*, no suele estar presente y de estarlo, es de tamaño reducido. Aunque la función del exosporio es actualmente desconocida, dada la patogenicidad de muchas cepas del grupo de *B. cereus*, se ha relacionado con la interacción de los esporos con los organismo diana (Setlow, 2006).

Por debajo del exosporio se encuentra el **interespacio** o *interspace* que le separa de la **capa externa** o *coat*. El *coat* es una estructura proteica compleja compuesta por diferentes capas. En el caso de *B. subtilis* el coat contiene alrededor de 50 proteínas, muchas de las cuales son resultado de la expresión de genes específicos de los esporos. La función individual de la mayoría de estas proteínas es desconocida, aunque unas pocas son proteínas morfogénicas implicadas en el ensamblaje de la capa externa y del exosporio (Bailey-Smith y col., 2005). Esta capa es importante en la resistencia de los esporos a algunos agentes químicos o a enzimas líticas exógenas que pueden degradar la corteza, pero tiene poco o ningún papel en la resistencia de los esporos frente al calor, la radiación y algunos químicos (Setlow, 2011).

La **membrana externa** se encuentra situada justo debajo de la capa externa. La función específica de esta membrana todavía no está clara, aunque se cree que es esencial en la

formación del esporo (Piggot y Hilbert, 2004). Sin embargo, se duda de que mantenga su integridad una vez formado el esporo latente y, por consiguiente, es probable que no sea una barrera de permeabilidad significativa. De hecho, la eliminación de la membrana externa junto con la capa externa de los esporos no tiene un efecto notable en su resistencia al calor, la radiación y algunos compuestos químicos (Setlow, 2011,2014).

La **corteza** o *cortex* está compuesta de peptidoglicano (PG) con una estructura similar al peptidoglicano de la célula vegetativa, pero en este caso las moléculas de glucosamina y de ácido murámico, que son los componentes mayoritarios, se encuentran muy acetiladas. Esta corteza es esencial para la formación del esporo latente y para la reducción del contenido de agua dentro del protoplasto. El mecanismo por el cual la corteza produce la deshidratación del protoplasto se desconoce, aunque se cree que podría deberse a la simple compresión mecánica. Otra de las características específicas de esta estructura es la presencia de una molécula exclusiva del esporo llamada muramo δ -lactama que se une a un porcentaje elevado de los residuos de ácido murámico. Esta molécula posibilita el reconocimiento específico de enzimas líticas presentes en la propia corteza que, de esta forma, degradan esta estructura durante la germinación de los esporos sin afectar a la pared celular. La degradación del *cortex* resulta esencial para la expansión del protoplasto y el posterior crecimiento (Setlow, 2003; Tan y Ramamurthi, 2014).

La **pared de la célula germinante**, también conocida como *germ cell wall*, se encuentra entre la corteza y la membrana interna. Esta pared, al igual que la corteza, está compuesta por peptidoglicano, pero con una estructura probablemente idéntica a la de las células vegetativas. La pared celular de la célula germinante se cree que no juega un papel importante en la resistencia del esporo, pero se convierte en la pared celular de la célula en crecimiento (Setlow, 2006).

En contraste con la membrana externa, la **membrana interna** es una fuerte barrera de permeabilidad que juega un papel importante en la resistencia de los esporos a muchos compuestos químicos y, en particular, a aquellos que pueden dañar al ADN (Cortezzo y Setlow, 2005). Esta estructura aparece comprimida en el esporo latente, pero cuando empieza a germinar, prácticamente duplica su volumen durante los primeros minutos sin necesidad de consumir ATP (Cowan y col., 2004). Los lípidos que forman parte de la membrana interna se encuentran inmóviles hasta que comienza la germinación. Las particularidades que puede presentar la membrana interna de los esporos no se deben a su composición lipídica, que es muy similar al de las células en crecimiento (Cortezzo y Setlow, 2005).

INTRODUCCIÓN

Por último, en la parte más interna del espora, se encuentra el **protoplasto** o *core*, análogo al citoplasma de las células en crecimiento. Esta estructura contiene el genoma compactado y unido a un grupo especial de proteínas solubles en ácido de bajo peso molecular (SASP, *small acid soluble proteins*). También contiene la mayoría de las enzimas del espora, el ADN, los ribosomas y el ARNt. Por otro lado, el protoplasto está parcialmente deshidratado ya que el agua es sustituida por DPA quelado con cationes divalentes (en especial Ca^{2+}). Esta molécula representa entre el 5 y el 15% del peso seco de los esporos en especies de *Bacillus* y *Clostridium*, y se localiza exclusivamente en el protoplasto. La síntesis de esta molécula tiene lugar en la célula madre de la célula esporulante y es absorbida por el preespora. Posteriormente, cuando se produce la germinación, esta molécula es excretada al exterior. La deshidratación del protoplasto limita el movimiento macromolecular y la actividad enzimática, lo cual juega un papel muy importante en la latencia del espora y en su resistencia a diferentes agentes, como puede ser el calor húmedo.

1.2.1.2.1.3 Resistencia del espora a diferentes agentes

Los esporos poseen una gran resistencia al calor húmedo y seco, a las radiaciones, a compuestos químicos (peróxidos, formaldehído, agentes alcalinizantes, etc) y a otros estreses como podrían ser el estrés osmótico, las altas presiones hidrostáticas, ciclos de congelación y descongelación, etc. (Gould, 1984; Setlow, 2006; Zuber, 2009; Setlow, 2011). Esta resistencia se ha atribuido a su estructura, y también a la presencia en su interior de ácido dipicolínico (DPA), las SASP y a una baja actividad de agua.

El **DPA** está localizado en el protoplasto, donde se encuentra quelado por cationes divalentes, principalmente Ca^{2+} , aunque hay cantidades significativas de Mg^{2+} y Mn^{2+} , y proporciones más pequeñas de otros cationes. La cantidad de DPA en el protoplasto está muy por encima de su solubilidad, ya sea quelado con cationes divalentes o no, pero se desconoce su estado físico exacto en el protoplasto. Se ha sugerido que el protoplasto se encuentra en estado vítreo, al que podría contribuir el DPA, pero por el momento no ha sido demostrado (Leuschner y Lillford, 2003). La mayor resistencia de los esporos debida a este compuesto podría deberse a que la acumulación de DPA en el protoplasto es responsable de la reducción en su contenido de agua y/o a que protege al ADN, por ejemplo frente a la radiación ultravioleta (Setlow, 2006).

Las **SASP** pueden ser de dos tipos, α y β (Setlow y Setlow, 1995; Driks, 2002). Las SASP son sintetizadas únicamente durante el desarrollo del preespora en la última fase de la

esporulación, ligeramente antes de la acumulación del DPA. Estas pequeñas proteínas, compuestas por alrededor de 60-75 aminoácidos, son extremadamente abundantes en los esporos, donde representan alrededor de un 3-6% del total de proteínas. Además, las SASP son el resultado de la expresión de entre cuatro y siete genes, en las especies del género *Bacillus*, que están distribuidos por todo el genoma. Todos estos genes parecen expresarse en paralelo, generalmente dos a muy alto nivel (*sspA* y *B*) y el resto a niveles mucho más bajos. Las secuencias de aminoácidos de estas proteínas están muy conservadas en *Bacillus* y *Clostridium*. Sin embargo, las SASP de tipo α/β no tienen homólogos en las formas no esporuladas y muestran estructuras muy diferentes a las de otras proteínas (Setlow, 2011).

Las SASP se encuentran exclusivamente en el protoplasto, donde saturan el ADN del esporo, alterando drásticamente su estructura y su resistencia al calor, diversos compuesto químicos y a la radiación UV. Se ha observado que la ausencia de estas proteínas en el protoplasto de los esporos de cepas mutantes sin los genes responsables de su síntesis, provoca un descenso de la resistencia a gran variedad de tratamientos. Estos cambios pueden ser debidos a que la esporulación ha sido levemente alterada, a cambios en la síntesis de la cubierta proteína externa, o simplemente aun menor efecto protector sobre el ADN (Tennen y col., 2000; Genest y col., 2002; Young y Setlow, 2003; Shapiro y col., 2004; Setlow, 2011). Por último, cabe destacar que las SASP se degradan temprano en el esporo en crecimiento. Si esto no ocurre, su presencia interfiere significativamente en el posterior desarrollo, presumiblemente boqueando la transcripción del ADN (Setlow, 2006).

Por último, la **baja actividad de agua** en el protoplasto también confiere resistencia al esporo. A diferencia de las células en crecimiento, que contienen alrededor de un 75-80% de agua en su interior, los esporos solo contienen un 27-55% de agua en el protoplasto, aunque el porcentaje depende de las especies. Esta baja cantidad de agua en el protoplasto dificulta el movimiento de las macromoléculas, inhibe la actividad enzimática y determina la resistencia de los esporos frente al calor húmedo. Según hemos indicado, el mecanismo de reducción del contenido de agua en el protoplasto durante la esporulación todavía se desconoce. Como cabe esperar, el protoplasto capta rápidamente agua del exterior en los primeros minutos de la germinación del esporo facilitando el movimiento de las macromoléculas y la restauración de la actividad enzimática (Setlow, 2006; Sunde y col., 2009).

1.2.1.2.1.4 La germinación: vuelta a la forma vegetativa

Los esporos latentes monitorizan el medio ambiente en el que se encuentran y cuando las condiciones son de nuevo favorables para el crecimiento, germinan y, como consecuencia, revierten al estado vegetativo. Este proceso se conoce como **germinación**. Además de su interés intrínseco, la germinación de los esporos resulta de gran importancia, ya que es después de la germinación cuando los esporos causan el deterioro de los alimentos y las enfermedades de origen alimentario. La transición de espora en estado latente a célula vegetativa implica tres fases: activación, germinación y desarrollo.

La **activación** del espora puede provocarse aplicando calor, cambiando el pH o exponiéndolo a determinadas sustancias químicas y se considera un paso previo y necesario para el comienzo de su germinación. Es un proceso reversible, por tanto, los esporos activados conservan la mayoría de propiedades de su forma latente. Por el contrario, una vez que los esporos inician la germinación, aunque puede pararse/ralentizarse, ya no pueden revertir a su estado latente (Setlow, 2003).

Los esporos probablemente solo **germinan** en la naturaleza como respuesta a la presencia de algunos nutrientes específicos, denominados germinantes. Estos germinantes son, generalmente, aminoácidos, azúcares o nucleótidos, pero también una combinación de nutrientes puede desencadenar la germinación del espora. Por ejemplo, en el caso de *B. subtilis*, la germinación se inicia en presencia de una mezcla de asparagina, glucosa, fructosa y K^+ (Setlow, 2003). Una vez iniciada la germinación por contacto con nutrientes, el proceso es irreversible, incluso después de eliminar el compuesto germinante. Aunque no se conoce el mecanismo íntimo por el cual el espora comienza a germinar, sí que se han descrito las fases de la germinación (Figura 1.10).

Durante la primera etapa, los germinantes se unen a receptores específicos ubicados en la membrana interna del espora. Estos receptores están constituidos por grupos de tres proteínas, conocidas como GerP y codificadas por homólogos del operón *gerA* (*gerA*, *gerB*, *gerK*), que se expresan en el preespora durante las últimas etapas de la esporulación. Estas proteínas del tipo GerA son similares en los esporos de las especies tanto de *Bacillus* como de *Clostridium*. En el caso de los esporos de *Bacillus*, la proteína GerA reconoce principalmente la L-alanina, mientras que los receptores GerB y GerK responden conjuntamente a la combinación AGFK (asparagina, glucosa, fructosa y K^+). Además, *B. subtilis* también dispone de dos operones homólogos *gerA* cuyas funciones son desconocidas. Tampoco puede explicarse

con exactitud cómo interactúan estos receptores entre sí o con otras proteínas, ni el motivo por el cual algunos esporos de *B. subtilis* con mutaciones en estos genes pueden iniciar la germinación sin disponer de dichos receptores (Setlow, 2003).

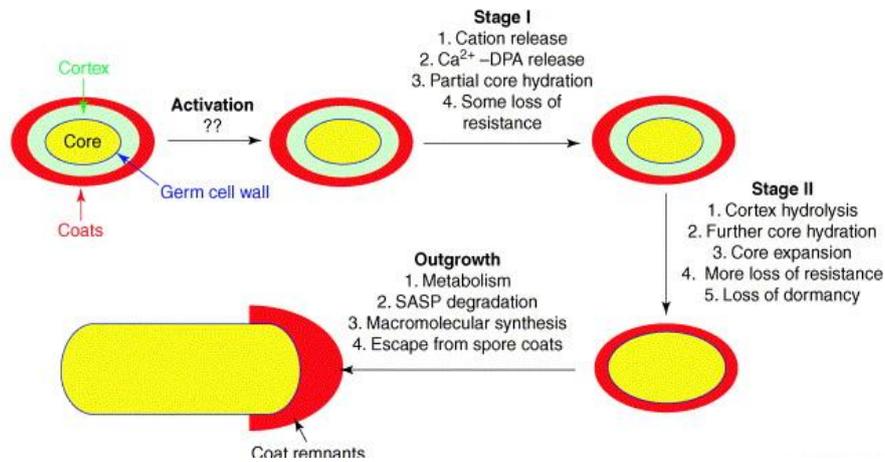


Figura 1.10. Fases durante la germinación de los esporos (Setlow, 2003).

Como respuesta inmediata a la unión germinante-receptor se inicia la salida de los cationes monovalentes del protoplasto hacia el exterior del espora, seguido de la liberación de protones H^+ y Zn^{2+} . La disminución de H^+ conlleva un incremento en el pH, que parece ser esencial para el metabolismo posterior del espora. Posteriormente, aunque también durante esta primera etapa, se libera el depósito de ácido dipicolínico junto a los cationes divalentes asociados (principalmente Ca^{2+}), también almacenados en el protoplasto, lo que produce su sustitución por agua, con la consiguiente rehidratación parcial del protoplasto y pérdida parcial de termorresistencia. No obstante, en este punto, el volumen de agua alcanzado no es suficiente para permitir la movilidad de las proteínas o reiniciar la actividad enzimática (Setlow, 2003,2014).

Durante la segunda etapa, se produce la hidrólisis enzimática del peptidoglicano del *cortex*, permitiendo la entrada de una mayor cantidad de agua que inmediatamente es absorbida por el protoplasto. Debido a esta entrada, se produce la expansión del protoplasto, de pared de la célula germinante (*cell germinant wall*) y de la membrana interna, y se reinicia la actividad enzimática. La rehidratación completa y la reactivación enzimática del protoplasto dependen por tanto de la hidrólisis de la corteza o *cortex* que, por el contrario, no era esencial para el desarrollo de la anterior etapa. Esta hidrólisis es mediada por una serie de enzimas líticas, aunque todavía se desconoce su mecanismo exacto de acción. En *B. subtilis* se han identificado dos enzimas principales: CwlJ, que responde al DPA y se sitúa en la corteza y en la capa externa del espora; y SleB, que se localiza en la membrana interna y en la capa externa.

INTRODUCCIÓN

Ambas se sintetizan durante la esporulación, CwlJ en la célula madre y SleB en el preesporo (Moir, 2006). Estas enzimas reconocen el muramo δ -lactama presente en el peptidoglicano de la corteza, por lo que su presencia es necesaria para que se inicie la hidrólisis. La ausencia de esta molécula en la pared de la célula germinante impide que sea degradada y que actúe como pared celular de la nueva célula en crecimiento. Cabe destacar que, puesto que las enzimas CwlJ y SleB se sintetizan directamente en su forma madura, debe existir algún mecanismo que las mantenga inactivas en el esporo latente. El mecanismo para SleB sigue siendo desconocido, sabemos que CwlJ precisa de CaDPA para su funcionamiento, de modo que hasta la liberación de este complejo en la primera etapa de germinación la enzima no puede actuar (Moir, 2006).

Por último, el **crecimiento** comprende todas las fases de desarrollo que se dan después de la germinación, incluyendo el inicio del metabolismo, la síntesis de macromoléculas, la degradación de las SASP, el desprendimiento de las capas exteriores y el crecimiento de la nueva célula (Setlow, 2003).

Además de los nutrientes germinantes, el esporo puede germinar en respuesta a otros agentes tales como lisozima, sales, altas presiones, Ca^{2+} -DPA y la dodecilamida (Figura 1.11). Aunque estos germinantes “no nutrientes” no son probablemente fisiológicos, utilizan varios de los componentes de la vía de germinación por nutrientes. Asimismo, es posible que el Ca^{2+} -DPA liberado de un esporo pueda estimular la germinación de otros esporos cercanos.

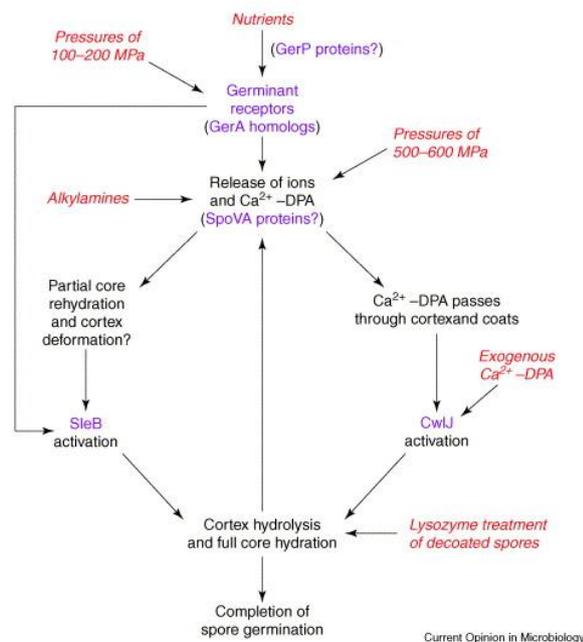


Figura 1.11. Esquema de la germinación de los esporos de *B. subtilis* mediante nutrientes y no nutrientes (Setlow, 2003).

1.2.1.3 Daño subletal y su reparación

Aunque el principal objetivo de los tratamientos tecnológicos para la conservación de los alimentos es la inactivación irreversible de los microorganismos, en muchas ocasiones se producen alteraciones en diferentes componentes por debajo del umbral crítico. Este tipo de alteraciones dan lugar a células **subletalmente dañadas** capaces de reparar estas lesiones y multiplicarse si las condiciones medioambientales son las adecuadas. Su aparición depende de múltiples factores entre los que destacan el tipo de agente, el tipo de microorganismo y las condiciones de tratamiento aplicadas. El conocimiento de la existencia de estos daños, su naturaleza, las condiciones en las que se producen y los requerimientos para su reparación son de vital importancia a la hora de diseñar procesos de higienización de los alimentos.

Mackey (2000) describió algunas técnicas para la detección del fenómeno de daño subletal:

- La adición de determinados compuestos inhibidores al medio de recuperación (siembra en ágar selectivos y no selectivos).
- La observación directa, o tras tinción, de las células o sus estructuras y sus posibles alteraciones.
- El estudio de la fase de latencia de crecimiento.
- El estudio de la capacidad de mantenimiento de la homeostasis intracelular.
- El estudio de la actividad de determinados enzimas.
- El estudio de las diferentes funciones celulares.

De entre todas las técnicas nombradas anteriormente la primera es sin duda la más utilizada. Esta técnica consiste en comparar los recuentos de supervivientes en un medio no selectivo y en uno selectivo. Para ello, es habitual la obtención de una gráfica en la que se representen el número de microorganismos supervivientes, tras un determinado tratamiento, en ambos medios. A modo de ejemplo se muestra la gráfica de la figura 1.12 en la cual el área rayada correspondería a la parte de la población que ha sufrido un daño subletal. Un medio selectivo para el estudio del daño subletal sería, por ejemplo, un medio convencional enriquecido con una concentración de cloruro sódico tal que impida el crecimiento de las células con la membrana citoplasmática alterada. Así, por comparación entre los recuentos en el medio con y sin sal puede detectarse y cuantificarse el número de células dañadas. De modo similar, pueden añadirse al medio de recuperación sustancias como ácidos, bases o algunos iones inorgánicos (cobre, selenio) para detectar también la presencia de daños en la

INTRODUCCIÓN

membrana citoplasmática. Por otro lado, la adición de sales biliares, lisozima, algunos antibióticos y determinadas sales inhiben el crecimiento de células con daños en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y de la capa externa de la pared de peptidoglicano de las bacterias Gram-positivas (Mackey, 2000).

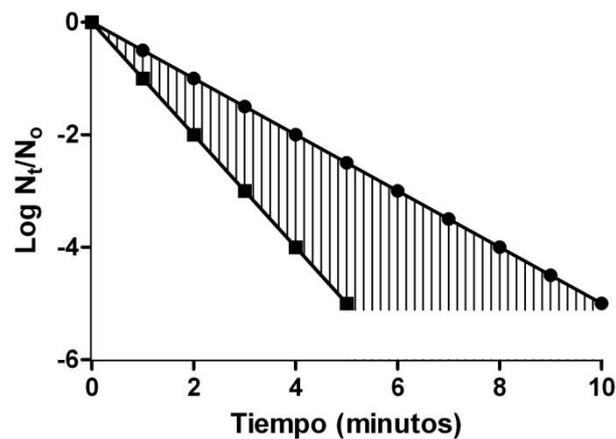


Figura 1.12. Efecto del medio de recuperación en la inactivación microbiana. Células recuperadas en un medio no selectivo (●) y en uno selectivo (■). El área rayada representa la parte de la población que ha sufrido un daño subletal.

Otra de las técnicas usadas para la detección de células dañadas subletalmente es la observación directa, o tras tinción, de las posibles alteraciones de las células o sus estructuras. Durante los últimos años se han descrito diferentes métodos para la detección de daños en las estructuras celulares mediante tinción. Por ejemplo, el método LIFE/DEAD utiliza dos fluorocromos para distinguir las células con daños en las membranas del resto de células. En este caso, el fluorocromo SYTO 9 permea a través de las membranas de todas las células y emite fluorescencia en verde tras unirse al ADN, mientras que el fluorocromo ioduro de propidio solo penetra cuando las membranas de las células están dañadas, emitiendo fluorescencia en rojo (Boulos y col., 1999; Dolezalova y Lukes, 2015).

Por otro lado, otro enfoque experimental frecuentemente usado para estudiar la presencia de daño subletal es el estudio de la cinética de crecimiento en medio líquido de las células que han sido sometidas a la acción de un agente estresante. A modo de ejemplo se muestra la figura 1.13, en la que se observa un incremento en la duración de la fase de latencia durante el crecimiento. Este efecto se debería a la necesidad por parte de las células de reparar el daño antes de comenzar su multiplicación.

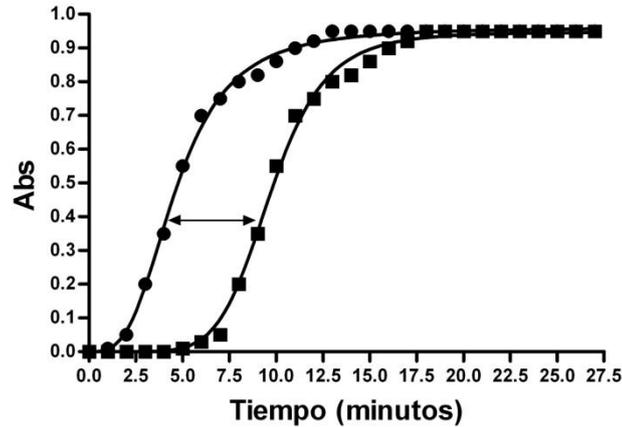


Figura 1.13. Efecto de la aparición de daño subletal en el crecimiento microbiano posterior al tratamiento. La flecha indica el incremento en la duración de la fase de latencia observado al comparar la gráfica de crecimiento de una población microbiana dañada subletalmente (■) con la original (●).

Además de las técnicas anteriores, el estudio de la actividad de determinados enzimas también sería un indicador de daño subletal en el interior celular. Para la determinación de la actividad enzimática estudios recientes describen diferentes metodologías, por ejemplo Li y col. (2017) utilizaron el colorante cFDA para evaluar la actividad enzimática. Este colorante permea a través de las membranas y es convertido por esterases inespecíficas en carboxifluoresceína, un colorante no permeable que emite fluorescencia en verde. Por otro lado, Zhao y col. (2014) usaron un sistema API ZYM (método semicuantitativo para la determinación de la actividad enzimática) para detectar cambios en la actividad enzimática intracelular cuando las células son expuestas a un tratamiento de pulsos eléctricos de alto voltaje. Además de estos métodos, pueden usarse kits comerciales específicos para la detección enzimas diversos.

El que las células sean capaces de reparar o no los daños producidos por diferentes agentes dependerá de que las condiciones medioambientales permitan la actuación de los sistemas de reparación celular. Estos sistemas están dirigidos a todos los componentes celulares.

Los sistemas integrados por proteasas (ClpP, ClpX, ClpQ o FtsH) y chaperones (DnaK, GroEL, etc.) se encargan de la **reparación de las proteínas** desnaturalizadas (Yura y col., 2000; Maleki y col., 2016). La concentración de estas proteínas suele aumentar tras la exposición de los microorganismos a condiciones estresantes subletales. En el caso más estudiado, el de la exposición a temperaturas subletales, este conjunto de proteínas se denominan genéricamente *proteínas del choque térmico*. Estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas tanto en células procariontas como eucariotas, y no sólo en organismos unicelulares sino también pluricelulares (Maleki y col., 2016), lo que da una idea de la importancia de su

INTRODUCCIÓN

función. Además, la presencia de estas proteínas ayuda a la reparación de prácticamente todas las estructuras celulares (membranas, ribosomas, enzimas citoplasmáticos, nucleóide, etc.).

Los microorganismos también poseen sistemas de **reparación del ADN**. A lo largo de los años se han descrito diferentes sistemas en función del tipo y nivel de daño. Entre ellos se pueden encontrar tres grandes grupos (Jara, 2004). En primer lugar, la inducción de la respuesta adaptativa “Ada” pone en marcha los sistemas de reparación de daño tras la exposición del ADN a agentes alquilantes. Esta respuesta activa numerosos genes encargados de reparar las alquilaciones del ADN debidas a la acción de diferentes sustancias químicas como el etilmetanosulfonato (Mielecki y col., 2015). En segundo lugar, los sistemas de reparación de los daños inducidos por agentes oxidantes están compuestos de más de 20 genes, en el caso de *E. coli*, que reparan las lesiones que sufre el ADN por acción de los ROS mediante la codificación de catalasas, reductasas y otras proteínas (Dempfle, 1991; Lushchak, 2014). Por último, el sistema SOS o sistema de reparación de emergencia, integrado por más de 40 genes, responde a las lesiones de una cadena del ADN, desencadenando la expresión de múltiples genes que participan en la reparación, replicación, recombinación y división celular (Friedberg y col., 2005; Baharoglu y Mazel, 2014).

Por lo que respecta a los **ribosomas y las envolturas celulares**, consideradas también como posibles dianas, existe un gran desconocimiento acerca de sus posibles mecanismos de reparación. Este hecho es especialmente sorprendente en el caso de las envolturas celulares ya que muchas de las técnicas de evaluación del daño subletal se basan, precisamente, en la detección de daños reparables en estas estructuras. Según los pocos datos publicados, las membranas externa e interna de las células bacterianas poseen cierta capacidad de recuperar su integridad sin ningún requerimiento biosintético o energético mediante la reorganización o sellado automático de las roturas (Chilton y col., 2001). Este fenómeno se ha observado en células de *E. coli* tratadas por Altas Presiones Hidrostáticas y Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (Chilton y col., 2001; García y col., 2006). Sin embargo, este sistema de reparación en muchas ocasiones es insuficiente por lo que la célula debe recurrir a otros mecanismos para reinstaurar la integridad y funcionalidad de las envolturas. Los requerimientos biosintéticos dependen de la estructura afectada, y del agente e intensidad del tratamiento, siendo las rutas metabólicas y sistemas de regulación que los controlan en gran medida desconocidos.

1.2.2 Cinética de inactivación, modelos predictivos y su relación con la fisiología microbiana

En la industria alimentaria, el uso de cualquier tecnología, tradicional o emergente, o la combinación de varias de ellas, requiere de datos científicos acerca de la respuesta microbiana. El estudio de la cinética de destrucción microbiana frente a estas tecnologías resulta esencial para el desarrollo de procesos que garanticen la inocuidad de los alimentos. Este estudio conlleva tanto su descripción desde un enfoque matemático, como el análisis de los aspectos de la fisiología celular que justifican la cinética observada. La naturaleza del agente aplicado, sus condiciones de aplicación (tiempo, intensidad, características del medio), y las características del microorganismo objeto de estudio determinarán la cinética observada y con ello el nivel de inactivación conseguido tras un determinado tratamiento.

En los últimos años, y gracias al enorme desarrollo de los recursos informáticos, se ha prestado especial atención al desarrollo de ecuaciones y/o modelos predictivos, que permitan describir con precisión el comportamiento microbiano, incluyendo la inactivación por diversas tecnologías. Los parámetros derivados de dichas ecuaciones o modelos permiten comparar la capacidad de los diferentes procesos tecnológicos para reducir las poblaciones microbianas. Hoy en día se considera que uno de los enfoques más útiles para la determinación del impacto microbiológico durante la producción, distribución y venta de los alimentos, y para la determinación de condiciones óptimas para el desarrollo de procesos de conservación es la microbiología cuantitativa o predictiva. La microbiología predictiva permite comparar el impacto de diferentes factores y dosis aplicadas sobre la reducción de una población microbiana, siendo una ayuda importante para entender y predecir el comportamiento microbiano (Alzamora y col., 2009).

Los primeros pasos en el estudio de la cinética de inactivación microbiana, y de la microbiología predictiva, los dieron Esty y Meyer (1922), quienes describieron la inactivación térmica de esporos de *Clostridium botulinum* tipo A utilizando un modelo logarítmico lineal. Este modelo se sigue utilizando rutinariamente para calcular los tratamientos a aplicar en el procesado térmico de alimentos enlatados de baja acidez. Después de un largo periodo sin publicaciones científicas relacionadas con la microbiología predictiva, su renacimiento se produjo entre las décadas de los 60 y 70, cuando se desarrollaron modelos para predecir la vida útil de los alimentos (Spencer y Baines, 1964; Nixon, 1971) y la probabilidad de que se produzcan toxiinfecciones (Roberts y col., 1981). Sin embargo, no fue hasta la década de los años 80 y una gran parte de los 90, cuando esta disciplina experimentó un gran impulso,

INTRODUCCIÓN

debido al aumento súbito de toxoinfecciones alimentarias, lo que quizás se debió a la mejora de los métodos de diagnóstico clínico. Una de las primeras definiciones de microbiología predictiva la propusieron McMeekin y col. (1993), describiéndola como una “ciencia cuantitativa que permite evaluar objetivamente la respuesta microbiana a las condiciones del procesado, la distribución y el almacenamiento y sus efectos en la seguridad microbiológica y la calidad de los alimentos”. En este contexto se publicó el Reglamento (CE) 2073/2005 sobre los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, en el que se reconoce, en su anexo II, el uso de los modelos microbiológicos predictivos como una herramienta útil para la gestión de la seguridad alimentaria. En el año 2011, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) publicó las pautas para la aplicación de lo dispuesto en el anexo II del reglamento antes mencionado.

A lo largo de los años, se han desarrollado modelos matemáticos que permiten predecir rápidamente la seguridad y vida útil de los alimentos, con el correspondiente ahorro económico. Aunque hay cierta diversidad en la clasificación de los modelos predictivos, básicamente los modelos más utilizados se clasifican en:

- Según el fundamento matemático: **modelo empírico** y **modelo mecanicista**. Los modelos empíricos se ajustan a una función matemática a partir de los datos obtenidos experimentalmente. Estos modelos son de interés por su aplicación práctica directa. Generalmente describen los datos de crecimiento o inactivación microbiana bajo condiciones experimentales controladas mediante una ecuación matemática sin ningún fundamento fisiológico. Algunos ejemplos serían: el modelo de Gompertz, las ecuaciones de raíz cuadrada, ecuaciones polinómicas, etcétera. Por otro lado, los modelos mecanicistas parten de una base teórica biológica, consideran diferentes hechos y obligan al modelo a adaptarse a la realidad biológica. Por ello, estos modelos predicen con mayor certeza los hechos observados (Bazin y Prosser, 1992; Legan y col., 2009). Sin embargo, estos modelos son naturalmente mucho más complejos y realmente no existe por el momento ninguno que incluya todas las variables intrínsecas y extrínsecas que afectan al comportamiento microbiano (Ross y McMeekin, 1995; Fakruddin y col., 2011).
- Según su finalidad: **modelos cinéticos** (crecimiento e inactivación) y **modelos de probabilidad**. Los modelos cinéticos son aquellos en los que a cada punto de un conjunto de variables independientes le corresponde un único valor de la variable dependiente. Estos modelos son especialmente útiles en los sistemas que evolucionan con el tiempo, como por ejemplo para el estudio del efecto de variables intrínsecas y

extrínsecas tales como la temperatura. En cambio, en los modelos probabilísticos se asigna a cada condición experimental un conjunto de variables independientes que pueden tomar valores diversos, cada uno de ellos con una probabilidad asociada. La base que se establece para la modelización probabilística es la relación existente entre el crecimiento o inactivación de las células microbianas y las propiedades físico-químicas del ambiente (Ross y McMeekin, 1995) que condicionarán el comportamiento microbiano y las probabilidades de que acontezca un suceso. Por ejemplo, el cálculo de la probabilidad de crecimiento o inactivación microbiana puede ayudar a tomar decisiones acerca de la formulación, procesado, envasado y almacenamiento de un producto (Dette y col., 2005).

- Según su estructura: **modelos primarios, secundarios y terciarios**. Los modelos primarios son aquellos que describen cómo varía el número de microorganismos en función del tiempo (crecimiento o inactivación). La estimación del crecimiento o inactivación puede obtenerse a partir de unidades formadoras de colonias (ufc), biomasa, medidas de absorbancia, concentración de sustratos o concentración de productos metabólicos (Geeraerd y col., 2004). Los modelos secundarios son aquellos que caracterizan los parámetros característicos de los modelos primarios (fase de latencia, tasa de crecimiento específica, densidad máxima de población, etc.) con respecto a uno o más factores extrínsecos (temperatura, pH, actividad de agua, etc.). Por último, los modelos terciarios se obtienen por integración de los primarios y secundarios, mediante el uso de una herramienta informática. Estas herramientas, cada vez más asequibles, ahorran a los usuarios tediosos cálculos matemáticos y tiempo.

A continuación se describe, utilizando el calor como agente modelo, la cinética de inactivación microbiana y cómo utilizar modelos matemáticos para describirla, tratando de relacionar los parámetros de las ecuaciones con los aspectos fisiológicos relevantes.

Los experimentos llevados a cabo por Bigelow y Esty (1920) y Esty y Meyer (1922) demostraron que la inactivación microbiana por calor es definible matemáticamente. Estos autores observaron que a intervalos iguales de tiempo, y a una temperatura constante, se destruía un porcentaje fijo de la población de células sometidas a la acción del calor; es decir, durante un tratamiento térmico el número de microorganismos supervivientes era una función exponencial del tiempo. Esta relación les permitió describir el orden logarítmico de destrucción microbiana según la siguiente ecuación:

INTRODUCCIÓN

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

Donde:

- N (ufc/mL) representa la concentración final de células
- $N(0)$ (ufc/mL) representa la concentración inicial de células
- t es el tiempo de tratamiento (unidad de tiempo)
- k_{max} es la velocidad específica de inactivación (1/unidad de tiempo, generalmente en minutos)

Considerar que la destrucción microbiana sigue una cinética de primer orden conlleva una serie de consecuencias que conforman los pilares básicos de la termobacteriología:

- Es posible calcular los tratamientos térmicos adecuados para garantizar la salubridad y estabilidad de los alimentos, asumiendo un determinado riesgo.
- La esterilidad absoluta no se puede alcanzar con certeza. Puesto que el tiempo de tratamiento no puede ser infinito siempre existirá un riesgo de supervivencia.
- Las posibilidades de supervivencia de una población microbiana sometida a un tratamiento térmico, a una temperatura determinada, serán función de la termorresistencia intrínseca del microorganismo en las condiciones de tratamiento empleadas, de la concentración inicial de células viables y del tiempo de calentamiento.

Este tipo de cinética de inactivación implica que a iguales intervalos de tiempo se destruye una proporción igual de la población. Como muestra la figura 1.14 si se representa el logaritmo del número de microorganismos, en vez del número de microorganismos como tal, se obtendrá una gráfica con perfil recto, denominada gráfica de supervivencia.

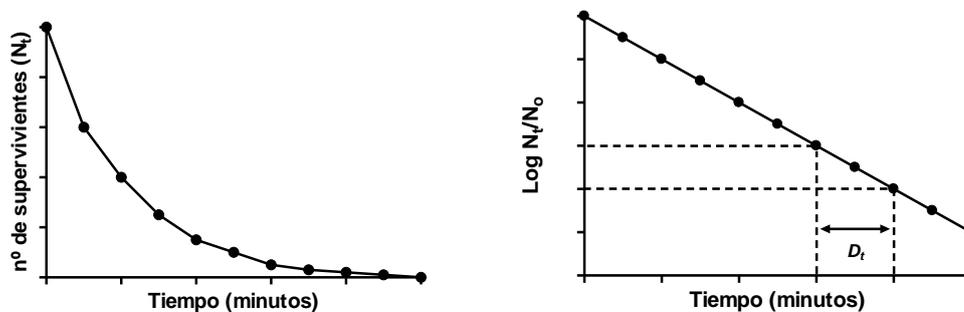


Figura 1.14. Efecto del tiempo de tratamiento en la supervivencia microbiana al calor. Gráfica de supervivencia.

A lo largo de los años, se ha ido profundizando en el estudio de la resistencia al calor y se ha comprobado que ésta es muy diferente para los distintos microorganismos y condiciones de tratamiento. Por ello, el establecimiento de un parámetro que definiera y permitiera su comparación ha sido de gran ayuda. Así, Katzin y col. (1943), describieron el concepto de valor D_t , o tiempo de reducción decimal, definido como el tiempo en minutos a una temperatura determinada que es necesario tratar a una población microbiana para que el número de microorganismos viables se reduzca a la décima parte, o lo que es lo mismo, para reducir el recuento un ciclo logarítmico. Este valor es por tanto el inverso negativo de la pendiente de la gráfica de supervivencia.

Al aumentar la temperatura aumenta la velocidad de inactivación. Para cuantificar este cambio de velocidad se creó un nuevo parámetro, el valor z . Relacionando el logaritmo del tiempo de reducción decimal con la temperatura se obtiene la línea de termodestrucción, que también es una recta. El valor z , que se define como el número de grados que es necesario aumentar la temperatura de tratamiento para reducir el valor D_t a la décima parte, o lo que es lo mismo, para que la línea de termodestrucción atravesase un ciclo logarítmico es el inverso negativo de la pendiente de la línea de termodestrucción.

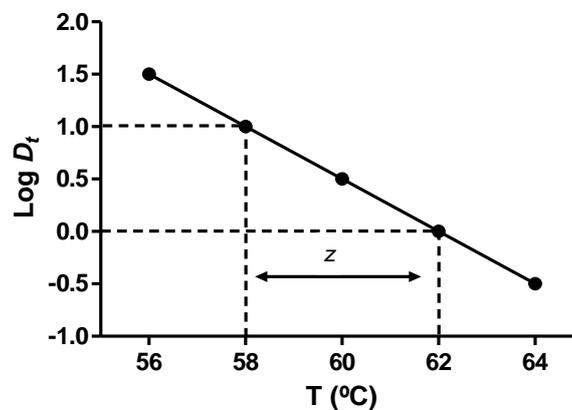


Figura 1.15. Cálculo del valor z a partir de la representación gráfica de la relación existente entre los valores D_t y la temperatura para un microorganismo hipotético.

Según Gould (1989) la teoría más aceptada para explicar la cinética exponencial de inactivación microbiana por el calor está basada en principios termodinámicos. Esta teoría asume que todas las células muestran la misma o similar termorresistencia, siendo las moléculas del medio que rodean las estructuras celulares diana las que presentarían una distribución de energías de tipo Boltzmann. En estas condiciones, la cinética de muerte celular seguirá un orden exponencial siempre que se deba a la inactivación de una molécula, de la que debería haber tan sólo una o muy pocas copias en cada célula, y que la inactivación sea un

INTRODUCCIÓN

fenómeno del tipo todo o nada. Es decir, según esta teoría el ritmo de inactivación será el reflejo de un fenómeno probabilístico.

Asumiendo esta hipótesis, la molécula clave de la inactivación por calor sería, muy probablemente, el ADN, ya que normalmente es una estructura única de cada célula y semejante en todos los componentes de la población. Sin embargo, actualmente existen nuevas evidencias que hacen discutible esta teoría. Por una parte se ha demostrado que muchas estructuras celulares resultan dañadas por la acción del calor y, que dicha alteración puede, en determinadas circunstancias, conducir a la muerte celular (Mackey, 2000). Por otra parte, se ha demostrado que el ADN sólo es dañado “*in vitro*” a temperaturas elevadas, muy por encima de aquellas letales para las células vegetativas. Finalmente, hoy en día se sabe que la inactivación por calor no es un fenómeno de tipo “todo o nada”, sino que es habitual la presencia de células dañadas subletalmente, es decir, de células que pueden recuperarse o no dependiendo de las condiciones posteriores de recuperación (Mañas, 1999; Mackey, 2000).

Quizás estas incongruencias puedan explicar el hecho de que, aunque las gráficas de supervivencia frente al calor generalmente siguen un curso lineal, con relativa frecuencia aparecen desviaciones de la linealidad en forma de “hombros”, debido a retrasos en el comienzo de la inactivación, y “colas”, debido a retrasos en la inactivación al final de la gráfica de supervivencia, o incluso de ambos fenómenos simultáneamente, observándose perfiles sigmoideos (Figura 1.16). Sin embargo, no existe una causa general que pueda explicar todas estas desviaciones, lo cual no es de extrañar dada la diversidad microbiana y los múltiples eventos que se ven implicados en la inactivación térmica. Estas desviaciones, al margen de los posibles errores metodológicos atribuibles a imprecisiones en los sistemas de evaluación de la termorresistencia, pueden aparecer como parte de la cinética de inactivación, y deben considerarse a la hora de calcular los tratamientos térmicos.

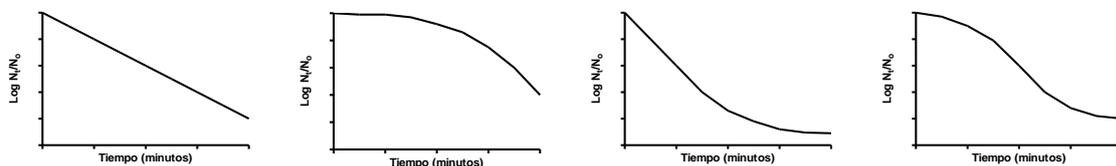


Figura 1.16. Desviaciones de la linealidad en las gráficas de supervivencia al calor. A: Cinética lineal: Perfil recto. B: Presencia de hombros: Perfil convexo. C: Presencia de colas: Perfil cóncavo. D: Presencia de hombros y colas: Perfil sigmoideo.

El fenómeno de hombro, es un fenómeno muy común que consiste en la desviación del orden logarítmico de inactivación de forma que durante los primeros momentos de calentamiento el recuento se mantiene constante, pudiendo incluso llegar a registrarse un

incremento en el número de supervivientes. Puede ser debido a simples artefactos metodológicos, como aquellos que se dan cuando se utilizan métodos de calentamiento con una baja transferencia de calor. En estos casos, la fase “lag” de calentamiento anisotérmico es la responsable del retraso en el comienzo de la inactivación. Sin embargo, son muchos los autores que han documentado razones fisiológicas como responsables de los hombros. Como hemos discutido previamente, la inactivación térmica no es un fenómeno del tipo todo/nada, sino que se producen situaciones intermedias del daño. Según Moats y col. (1971b) se necesita la inactivación de un gran número de sitios críticos antes de que las células mueran. En estos casos, mientras la célula sea capaz de reparar esos daños, el recuento no disminuirá, y solo cuando el daño acumulado supere la capacidad fisiológica de reparación celular se producirá la inactivación (Wang y col., 2017). Esta es una causa frecuente de aparición de hombros en las gráficas de supervivencia, tanto en células vegetativas como en esporos bacterianos. Además, la heterogeneidad genética y fenotípica de las células en una población es otra posible causa de aparición de hombros (Hornstra y col., 2009) y, en el caso más concreto de los esporos bacterianos, el hombro se ha relacionado también con el fenómeno de activación. Así, durante los primeros momentos del tratamiento térmico de una suspensión de esporos, el recuento es resultado de dos fenómenos simultáneos y contrapuestos: la activación de los esporos latentes, que tienden a aumentar el recuento, y la muerte de los esporos activos, que tienden a disminuirlo. Del balance entre ambos fenómenos dependerá la existencia y/o perfil de los hombros (Corradini y col., 2010). Por otro lado, este fenómeno tradicionalmente también se ha atribuido a procesos de agregación celular. Así, la agregación confiere a los microorganismos una mayor protección frente al tratamiento térmico. Hansen y Riemann (1963) ya demostraron que el tratamiento ultrasónico de suspensiones de *Streptococcus faecium* eliminaba el hombro de las gráficas de supervivencia al conseguir la desagregación celular.

El fenómeno de cola es otro fenómeno frecuente de desviación de la linealidad, y se define por la aparición de porciones finales de la gráfica de supervivencia donde disminuye o incluso se detiene el ritmo de inactivación. Dadas sus importantes repercusiones prácticas se le ha dado mayor atención. Para una más fácil descripción de sus causas los autores suelen utilizar la clasificación de Cerf (1977), que agrupa las teorías existentes en dos grupos:

- a) Vitalistas: que atribuyen la aparición de colas a la existencia de una distribución heterogénea de resistencias en el seno de la población. De esta forma, al comienzo del tratamiento térmico las células más termosensibles se inactivarían rápidamente, siendo esta fracción habitualmente la más numerosa, y posteriormente disminuiría la pendiente de la gráfica de supervivencia, al ser esta

porción la parte correspondiente a la inactivación de las fracciones de la población más resistentes.

- b) Mecanicistas: que asumen la existencia de una cinética exponencial de inactivación y relacionan la aparición de colas con anomalías, de causa metodológica o no. Se ha demostrado que determinados fallos metodológicos en la determinación de termorresistencia pueden ser responsables de la aparición de este fenómeno de cola. Así, por ejemplo, en el método de tubos para la determinación de termorresistencias pueden producirse notables diferencias de temperatura en las diferentes zonas del medio de tratamiento de manera que la células ubicadas en las zonas más frías podrían dar lugar a la aparición de colas (Hansen y Riemann, 1963). Esta circunstancia ha sido demostrada por algunos autores que observaron que las colas desaparecía al aplicar el tratamiento térmico en ampollas cerradas totalmente sumergidas (Roberts y col., 1965). También es sabido que la termorresistencia microbiana cambia con la fase de crecimiento, por ello, en un cultivo mal sincronizado podrían coexistir células en diferentes fases de crecimiento y, por tanto, con diferente resistencia al calor. Además, incluso células en el mismo estado metabólico muestran diferente resistencia en función de las características físico-químicas del medio de calentamiento por lo que, dada la diversidad en la composición química de las diferentes partes de un alimento, sería lógico observar aparición de colas debidas, por ejemplo, a la presencia de los microorganismos suspendidos en porciones grasas, donde la actividad de agua es muy reducida y, por tanto, les confiere mayor resistencia (Jay, 1998). Al margen de estos y otros ejemplos, merecen especial mención las colas producidas por adaptación celular durante el propio tratamiento. Esta adaptación al calor, bien descrita a temperaturas subletales (Jørgensen y col., 1999; Metselaar y col., 2016), se ha demostrado incluso a temperaturas letales (Pagán y col., 1997; Lianou y Koutsoumanis, 2013), especialmente en calentamientos anisotérmicos (Hassani y col., 2006b; Hassani y col., 2007).

Los perfiles sigmoideos, se achacan a la aparición de una combinación de los dos fenómenos antes citados, de forma que las gráficas de supervivencia presentan tanto retrasos en el comienzo de la inactivación como en las porciones finales de la gráfica. Este es sin duda el perfil menos frecuente y del que menos referencias bibliográficas existen. Algunos autores han sugerido que la coexistencia de diferentes especies y/o cepas en la misma suspensión podría ser una de las causas de aparición de estos perfiles sigmoideos. Esto se comprobó mediante la

determinación de la resistencia al calor con mezclas conocidas de diferentes microorganismos (Moats y col., 1971b). Sin embargo, en otros casos este comportamiento no puede ser atribuido a causas externas sino que es inherente al microorganismo en las condiciones de tratamiento aplicadas. Por ejemplo, algunos autores (Juneja y Marks, 2003; Miller y col., 2009) han encontrado perfiles sigmoideos tras el tratamiento térmico de *L. innocua*, que además cambiaba en función de la temperatura, la fase de crecimiento y la cepa estudiada.

Cabe destacar que las desviaciones de la linealidad descritas anteriormente son más frecuentes en el caso de las células vegetativas que en el de los esporos (Allwood y Russell, 1970; Gould, 2008), y son especialmente frecuentes en los tratamientos a baja temperatura durante largos periodos de tiempo. Estas diferencias podrían deberse a las diferentes moléculas implicadas en la inactivación de células vegetativas y de esporos bacterianos. Otra causa podrían ser las bajas temperaturas de tratamiento aplicadas para la inactivación de las células vegetativas, ya que en estas condiciones las células podrían continuar con su actividad metabólica, cambiando durante el propio tratamiento su composición, estructura y termorresistencia, incluso aunque parte de la población estuviese muriendo simultáneamente. En cualquier caso, esta breve revisión indica que la aparición de desviaciones en la linealidad de las gráficas de supervivencia no debe considerarse un fenómeno extraño sino esperable en muchas circunstancias.

En la actualidad y basándose en la frecuencia de las desviaciones de la linealidad documentadas, los problemas teóricos que plantea dar una base biológica-termodinámica al orden logarítmico de inactivación, y la práctica imposibilidad de que exista en la naturaleza una población microbiana cuyos individuos presenten exactamente la misma resistencia y se encuentren exactamente en las mismas condiciones físico-químicas, ha llevado a muchos autores a cuestionar la validez del modelo tradicional (Peleg, 2006). Por ello, los autores han propuesto diferentes modelos matemáticos para calcular y ajustar con fiabilidad los actuales tratamientos térmicos y de esta manera sustituir al modelo exponencial tradicional para efectuar los cálculos. Existen muchos modelos no lineales y excelentes revisiones al respecto (Smelt y Brul, 2014; Bevilacqua y col., 2015). De entre ellos destacan, por la frecuencia de utilización entre los tecnólogos de alimentos, el modelo basado en la **distribución de Weibull** (Peleg y Cole, 1998), o el **modelo de Geeraerd** (Geeraerd y col., 2000; 2005), que presenta mayor interés en este trabajo, debido a que se trata de un modelo mecanicista, es decir, tiene una base biológica. Este modelo puede describir el comportamiento de los microorganismos cuando en las gráficas de supervivencia se hacen presentes fenómenos de hombro, fase log-lineal y cola (Geeraerd y col., 2000; 2005) y, lo que es más importante, cuantificar su magnitud.

INTRODUCCIÓN

El modelo de Geeraerd viene definido por la siguiente ecuación:

$$N(t) = (N(0) - N_{res}) \cdot e^{-k_{max} \cdot t} \cdot \left[\frac{e^{k_{max} \cdot S_l}}{1 + (e^{k_{max} \cdot S_l} - 1) \cdot e^{-k_{max} \cdot t}} \right] + N_{res}$$

Donde:

- $N(t)$ (UFC/mL) representa la concentración de células en el tiempo “t”
- $N(0)$ (UFC/mL) representa la concentración inicial de células
- N_{res} (UFC/mL) representa la concentración de células residuales (la cola de la gráfica de supervivencia)
- K_{max} es la velocidad específica de inactivación (1/unidad de tiempo)
- S_l es la duración del hombro (unidad de tiempo)
- t es el tiempo de calentamiento (unidad de tiempo)

El modelo de Geeraerd describe la cinética de inactivación de una población microbiana en función de la tasa de inactivación, la duración de los hombros y el nivel de recuento al que aparecen las colas, lo que posibilita su interpretación a través de fenómenos fisiológicos celulares. Además, este modelo asume que la parte central de la gráfica de supervivencia sigue un ritmo de inactivación exponencial, por lo tanto este modelo no contradice la teoría clásica de Bigelow y Esty. Además, este modelo se ha demostrado versátil y fácil de utilizar (Serrano, 2015).

Lógicamente, el aumento del conocimiento científico sobre la fisiología microbiana y su relación con la cinética de inactivación permitiría un mayor desarrollo de este tipo de modelos de base biológica para la correcta interpretación y comparación de los datos experimentales.

1.3 INACTIVACIÓN POR DIVERSOS AGENTES UTILIZADOS EN LA CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS

1.3.1 Tratamiento térmico

1.3.1.1 Introducción

Los tratamientos térmicos se han aplicado ampliamente en la industria alimentaria por su eficacia para obtener productos seguros y estables. Sin embargo, los tratamientos térmicos de alta intensidad pueden causar una desnaturalización proteica indeseable, pardeamientos no enzimáticos y pérdidas de vitaminas y de compuestos aromáticos volátiles, entre otros efectos indeseables. Por ejemplo, muchos consumidores consideran que el sabor a caramelizado de la leche esterilizada a baja temperatura es un defecto importante (Blake y col., 1995). Los avances científicos en el conocimiento del modo de acción de esta tecnología están permitiendo optimizar el procesado térmico para maximizar su eficacia frente a la flora contaminante, minimizando el deterioro de la calidad de los alimentos.

Cabe destacar que en los tratamientos térmicos son el **tiempo** y la **temperatura** los dos parámetros a controlar. Además, en aquellos tratamientos en los que el método de calentamiento sea indirecto también habrá que tener en cuenta el tiempo que tarda el alimento en alcanzar la temperatura de régimen, especialmente cuando se usan autoclaves. Además de por su contribución al efecto letal del tratamiento, la duración y características de la fase de calentamiento es importante porque puede inducir el desarrollo de termorresistencia a la temperatura de régimen (Mañas y col., 2003; Hassani y col., 2006a) y una mayor capacidad de recuperación del daño térmico (Hassani y col., 2007).

Como se ha descrito en la sección anterior, de forma general se ha asumido que existe una relación exponencial entre el número de microorganismos supervivientes al calor y el tiempo de tratamiento. De cara al diseño de tratamientos y para poder hacer comparaciones entre diferentes especies, condiciones o tratamientos, la termorresistencia microbiana suele expresarse con el valor D_t y el valor z .

1.3.1.2 Eficacia letal sobre diferentes microorganismos

En la actualidad el tratamiento térmico es considerado el único método de conservación de los alimentos capaz de garantizar simultáneamente la estabilidad y la salubridad de los productos tratados. Ello es debido a su capacidad para inactivar no sólo las células vegetativas

INTRODUCCIÓN

(Bolton y col., 2000; van Boekel, 2002; Aragao y col., 2007; Black y col., 2009; Rachon y col., 2016; Talukdar y col., 2017), sino también los mohos (Houbraken y col., 2006; Xu y col., 2015; Souza y col., 2017), las levaduras (Alwazeer y col., 2002; Shearer y col., 2002; Couto y col., 2005), las ascosporas de mohos (Rajashekhara y col., 1998; Panagou y col., 2002; Kim y Silva, 2016) y los esporos bacterianos (Cazemier y col., 2001; Coleman y col., 2007; Ghosh y col., 2009; Talukdar y col., 2017). Sin embargo, la termorresistencia de los diferentes grupos microbianos varía muy ampliamente en la naturaleza, lo que se debe a la existencia de especies microbianas con estructuras muy diferenciadas y a que sus mecanismos de resistencia e inactivación pueden ser totalmente diferentes. Un claro ejemplo sería la diferencia en termorresistencia de las células vegetativas y los esporos bacterianos.

Tradicionalmente se ha considerado que las formas vegetativas de las levaduras son menos resistentes que las bacterianas (Alwazeer y col., 2002), aunque algunos autores (Shearer y col., 2002) han observado lo contrario a pH ácido. En cualquier caso, tanto las levaduras como los mohos presentan una resistencia térmica muy variable. En general las hifas y las conidias de los esporos presentan baja resistencia al calor (Shearer y col., 2002), las esclerotias presentan más resistencia que las hifas y las conidias (Splittstoesser, 1991), pero menos que las ascosporas, que pueden llegar a presentar resistencias similares a algunos esporos bacterianos.

En cuanto a la termorresistencia de las bacterias vegetativas, se suele afirmar que las Gram-positivas son, en general, más resistentes que las Gram-negativas, y dentro de las primeras, las formas cocoides son más resistentes que las bacilares (Smelt y Brul, 2014). No obstante, la termorresistencia es muy variable, existiendo especies notablemente termosensibles, como el caso de *Aeromonas* o *Campylobacter* (Sörqvist, 2003); mientras que otras se muestran extraordinariamente resistentes, como *Enterococcus faecium* o *Salmonella senftenberg* 775W (Sörqvist, 2003; Smelt y Brul, 2014).

Por otra parte, los esporos bacterianos constituyen las formas de resistencia más eficaces de la naturaleza, de forma que son capaces de soportar la mayoría de los tratamientos habituales de pasteurización e incluso muchos de esterilización. Los tiempos de reducción decimal son en muchas ocasiones superiores a un minuto a 100°C, e incluso a 121°C. Generalmente se admite que los esporos del género *Bacillus* son más resistentes que los del género *Clostridium* (Smelt y Brul, 2014; Sadiq y col., 2016; Setlow, 2016).

Además de las diferencias entre géneros, también se han observado grandes diferencias dentro del mismo género e incluso de la misma especie. Diversos autores han observado una

gran variabilidad en la termorresistencia, por ejemplo entre cepas de *E. coli* O157:H7 (Stringer y col., 2000; Álvarez-Ordóñez y col., 2013) y *Salmonella* (Sherry y col., 2004; Lianou y Koutsoumanis, 2013), destacando el caso de *Salmonella senftenberg* 775W que presenta una termorresistencia muy superior a la de otros serotipos de *Salmonella* ($D_t \times 10$ aprox.), e incluso a la de *Listeria monocytogenes* (Lianou y col., 2006; Aryani y col., 2015), o *Staphylococcus aureus* (Cebrián y col., 2007; Amado y col., 2014), géneros normalmente mucho más termorresistentes que *Salmonella*.

A modo de ejemplo, la siguiente tabla muestra los valores D_t de diferentes especies microbianas.

Tabla 1.1. Rango de valores D_t de diferentes especies bacterianas en tampón y en alimentos (rango de pH 5,5-7,0; $a_w > 0,98$) (adaptada de Cebrián y col., 2017).

	Especies bacterianas	Temperatura (°C)	D_t (minutos)	z (°C)
Células vegetativas	<i>Aeromonas hydrophila</i>	60	<0,02	5,2-7,7
	<i>Campylobacter</i> spp.	60	<0,01-0,11	4,1-4,7
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	60	0,07-0,8	4,0-5,8
	<i>Salmonella enterica</i>	60	0,1-3,3	3,8-6,3
	<i>Cronobacter sakazakii</i>	60	0,05-2,0	4,1-6,2
	<i>Escherichia coli</i>	60	0,7-2,7	3,2-5,2
	<i>Staphylococcus aureus</i>	60	0,2-6,0	3,6-8,5
	<i>Listeria monocytogenes</i>	60	0,5-15	5,2-5,8
	<i>Enterococcus faecium</i>	60	5,0-30	4,3-8,0
Esporos	<i>Bacillus subtilis</i>	100	3,31->100	6,7-10,1
	<i>Clostridium botulinum</i> (proteolítico)	121	<0,01-0,22	7,6-12,1
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	121	0,1-5,0	7,3-12,2

1.3.1.3 Mecanismos de inactivación por el calor. Dianas celulares

En los últimos años se ha desarrollado un importante y continuado esfuerzo investigador con el objetivo de establecer las causas últimas de la inactivación microbiana por el calor. En la actualidad se conoce que el proceso que lleva a la muerte celular no es simple e incluye la alteración de numerosos componentes celulares. Pese a ello, y aunque se han realizado avances importantes, todavía no se ha llegado a establecer el mecanismo último de inactivación. Actualmente se considera que la inactivación microbiana por calor es un proceso con múltiples dianas. Se cree que el daño acumulado en diversas estructuras conduce a la muerte celular, pero la importancia relativa que el daño o desnaturalización de cada una de estas estructuras diana tiene en la inactivación microbiana es, hoy en día, desconocido.

Entre las estructuras implicadas se encuentran:

INTRODUCCIÓN

- La **membrana externa** de las células Gram-negativas. Cuando las células son sometidas a un tratamiento térmico se produce una permeabilización de la membrana externa que conlleva un aumento en la sensibilidad a diferentes compuestos como las sales biliares, la lisozima o ciertos antibióticos hidrofóbicos (Mackey, 1983; Boziaris y Adams, 2001; Russell, 2003; Cebrián y col., 2017). La permeabilización produce la liberación de proteínas periplásmicas, de moléculas de polisacáridos y de vesículas al medio extracelular durante el calentamiento (Tsuchido y col., 1985; Wesche y col., 2009; Halder y col., 2015; Cebrián y col., 2017).
- El **peptidoglicano** de la pared celular. Se ha observado, en el caso de *S. aureus*, que tras el tratamiento térmico se produce una pérdida de D-alanina de los ácidos teicoicos que conduce a la pérdida de Mg –quelado por el peptidoglicano de la pared celular-, lo que impide la utilización de los ácidos teicoicos; que quedan inmovilizados, en algunos procesos metabólicos esenciales para la célula (Mackey, 2000). En el caso de *Lactobacillus bulgaricus*, se ha observado, comparando el número de supervivientes recuperados en medio con y sin penicilina (inhibidor de la síntesis de peptidoglicano), que un tratamiento térmico a temperaturas superiores a 64°C podría producir daños subletales en la pared celular (Teixeira y col., 1997).
- La **membrana citoplasmática**. Muchos han sido los autores que han demostrado que esta estructura se ve alterada de distintas formas cuando las células se someten a un tratamiento térmico. Por ejemplo, se ha observado la pérdida de material citoplasmático de células tratadas por el calor (Allwood y Russell, 1967,1968; Russell y Harries, 1968a,1968b), la formación de vesículas y la pérdida de componentes de la propia membrana (Mackey, 2000). Sin embargo, aun conociendo estas alteraciones de la membrana citoplasmática, no se han podido relacionar hasta el momento con la pérdida de viabilidad celular. Varios autores han afirmado que la pérdida de funcionalidad de la membrana es un factor limitante de la supervivencia de la célula, ya que podría provocar alteraciones en la entrada y salida de determinados componentes (Hurst y Hughes, 1978; Coote y col., 1994), incapacidad de la célula para crecer en medios ricos en sales (Pagán, 1997; Mañas, 1999; Mackey, 2000), incapacidad para mantener el equilibrio osmótico (Teixeira y col., 1997), o la incapacidad para mantener el pH intracelular (González y col., 1996; Mazas y col., 1998). Mackey (2000) y Wuytack y col. (2003) observaron que estos fenómenos impedían a la célula recuperarse en medios selectivos. Pese a todas estas evidencias, actualmente se cree que la membrana citoplasmática no es la única estructura implicada en la inactivación microbiana por calor, aunque sí que las alteraciones que pudiera sufrir tienen una destacada importancia en los fenómenos de daño y

recuperación. Por ejemplo, la muerte celular podría deberse, indirectamente, a las consecuencias que estos daños tendrían en el metabolismo, homeostasis celular y estabilidad de otras estructuras celulares.

- El **ADN bacteriano** es una molécula esencial para la supervivencia microbiana y es uno de los componentes celulares con mayor estabilidad térmica, especialmente frente al calor seco (Gould, 1989; Russell, 2003). Sin embargo, el ADN se daña con tratamientos mucho menos intensos que los necesarios para su desnaturalización, sufriendo depurinaciones, depirimidaciones y/o roturas simples o dobles que lo dejan expuesto a la acción de las endonucleasas y a posteriores desnaturalizaciones (Kadota, 1978; Uchida y col., 1979; Russell, 2003). Todas estas alteraciones hacen sospechar que la desnaturalización del ADN se podría producir tanto durante el tratamiento térmico como posteriormente. Además, el estudio de los mecanismos de reparación han permitido ampliar notablemente nuestro conocimiento sobre el efecto del calor en el ADN. Así, Czechowicz y col. (1996), demostraron que era necesaria la adición de piruvato al medio de recuperación para conseguir la reparación de las células de *E. coli* O157:H7 tratadas por el calor. Mackey y Seymour (1987) demostraron que cepas mutantes en genes relacionados con la reparación del ADN (como *recA*, *recB* o *polA*) se mostraban más sensibles frente al calor, lo que indicaría que efectivamente el calor induce daños en el ADN y que este daño es subletal. Estos autores también observaron que la presencia de catalasa en el medio de recuperación aumentaba la resistencia de diferentes cepas mutantes hasta los niveles de los parentales. Este hecho sugiere que los daños producidos en el ADN por el tratamiento térmico resultarían, indirectamente, de una reacción de oxidación mediada por peróxido de hidrógeno u otras especies reactivas del oxígeno. Por último, Pellon y Sinskey (1984) señalaron que los componentes celulares dañados durante el tratamiento térmico podría ser reparados o reemplazados sólo si el ADN seguía siendo suficientemente funcional, lo que les hizo pensar que la reparación del ADN o su protección frente al daño es clave para la supervivencia microbiana.
- El **ARN y los ribosomas** son mucho más termosensibles que el ADN bacteriano (Earnshaw y col., 1995). Varios autores han relacionado la desnaturalización del ARN y la desestructuración de los ribosomas con la inactivación térmica, puesto que ambos fenómenos se producen en el mismo rango de temperaturas. Así, Mackey y col. (1991) demostraron que la sensibilidad al calor de las subunidades ribosómicas 30s y 50s era diferente y que, además, su resistencia aumentaba cuando se encontraban formando el complejo 70s. Estos mismos autores observaron que la desnaturalización, a alrededor de 47°C, de la subunidad 30s en *E. coli* estaba relacionada con su inactivación por calor, y que

a temperaturas comprendidas entre 47 y 85°C se producía su desnaturalización completa. Por su parte, Nguyen y col. (2006) observaron que la temperatura a la que se producía la desnaturalización de la subunidad 30s de los ribosomas de *Campylobacter jejuni* (entre 62-63°C) coincidía con aquella a la que se producía la mayor parte de la inactivación microbiana. Además, estos autores señalan que también varias proteínas que podrían ser críticas para la supervivencia bacteriana se desnaturalizarían en ese mismo rango de temperaturas. Algunos ejemplos serían, las unidades α y β de la ARN polimerasa, la proteína LysS (una sintetasa del tRNA), la proteína Pkg (una enzima que participa en la glicólisis), la proteína FtsZ (que participa en la iniciación de la división celular) y la proteína MurA (que se usa para la síntesis de la pared celular). Sin embargo, dado que estas proteínas podrían ser resintetizadas, su desnaturalización podría no resultar letal para la célula, aunque sí lo sería la desnaturalización de todos los ribosomas o de todas las copias de ARN polimerasa (Mogk y col., 1999; Kobayashi y col., 2003). Por otra parte, diversos autores describieron la importancia de la presencia de magnesio como estabilizador de la unión entre las subunidades ribosomales, sugiriéndose una posible implicación de este compuesto en la alteración térmica de estas estructuras. Así, Hurst y Hughes (1978) y Hurst (1984) demostraron que la degradación de las subunidades ribosómicas de células de *S. aureus* tratadas térmicamente dependía ampliamente de la concentración de iones Mg^{2+} presente durante el tratamiento. Estos resultados sugieren que quizás el daño térmico que sufren los ribosomas es debido a la pérdida de Mg^{2+} consecuencia de la permeabilización de las envolturas celulares.

- Otras dianas celulares, que forman parte de las estructuras anteriores o bien se encuentran en suspensión en el citoplasma, son las **proteínas**. La desnaturalización de las proteínas ocurre cuando las células son tratadas térmicamente a altas temperaturas. Esta desnaturalización puede conducir a la pérdida de funcionalidad, fenómeno especialmente importante en enzimas como la catalasa o la superóxido dismutasa, y a la alteración de estructuras vitales para la célula, como los canales o bombas de transporte presentes en las envolturas. No obstante, se admite que, en general, todos estos componentes se pueden resintetizar fácilmente tras el tratamiento (Miles, 2006). Hedén y Wyckoff (1949) observaron, mediante microscopía electrónica, que el citoplasma de las células tratadas por calor presentaba un aspecto granuloso, que podía ser reversible o no en función de la intensidad del tratamiento. Posteriormente, Russell y Harries (1968a,1968b) encontraron evidencias de la desnaturalización de las proteínas del citoplasma tras ese mismo tratamiento. Belliveau y col. (1992) afirmaron en sus trabajos que la inactivación de esporos bacterianos a temperaturas de esterilización era debida principalmente a la

desnaturalización de una o varias proteínas presentes en el citoplasma bacteriano, probablemente enzimas responsables de la germinación, más que a la desnaturalización del ADN, como tradicionalmente se asumía. Posteriormente, numerosos autores han concluido que el mal plegamiento y la agregación de las proteínas son las principales consecuencias de diversos estreses, por ejemplo cuando las células son sometidas a tratamientos térmicos, altas presiones, distintos compuesto químicos, etcétera (Mogk y col., 1999; Mogk y col., 2003; Tyedmers y col., 2010; Govers y col., 2017).

La figura 1.17 resume los principales cambios observados, hasta el momento, en las células bacterianas expuestas a un tratamiento térmico.

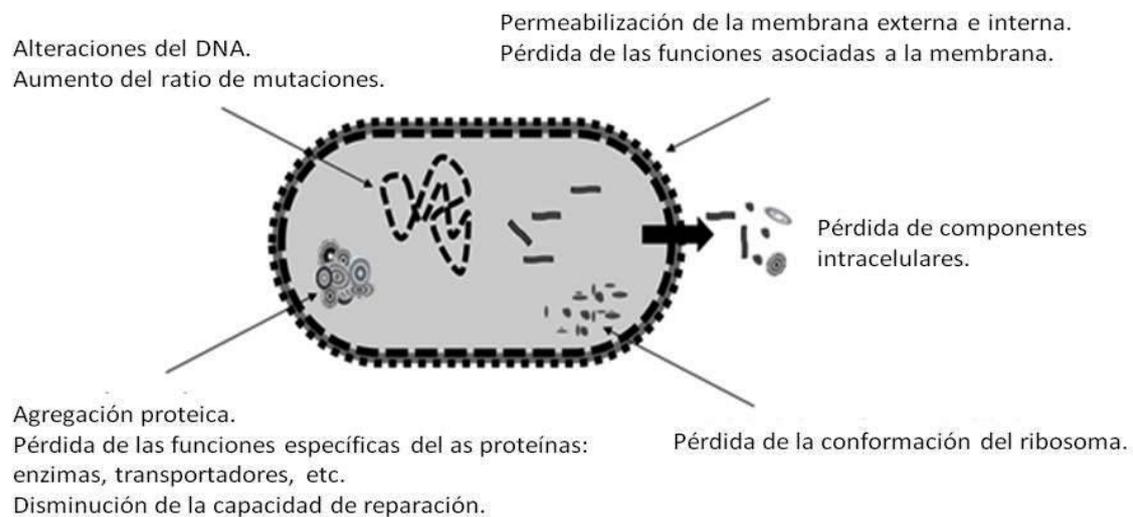


Figura 1.17. Resumen de los eventos celulares más relevantes que tienen lugar en la célula bacteriana durante su exposición al calor (adaptada de Cebrián y col., 2017).

De todo lo expuesto anteriormente se puede concluir que el calor es capaz de alterar múltiples estructuras y funciones celulares que, en determinadas circunstancias, pueden conducir a la pérdida de viabilidad celular. Este hecho apoya la idea de que la inactivación térmica no es un fenómeno del tipo “todo o nada” sino que durante el tratamiento se producen situaciones intermedias de daño cuya recuperación depende de múltiples factores.

1.3.1.4 Cinética de inactivación por calor

El calor ha sido usado previamente, en el apartado 1.2.2, como modelo para describir la cinética de inactivación y para explicar cómo usar los modelos matemáticos para describirla,

por lo que obviaremos este apartado que se incluye con el único fin de dar homogeneidad a esta sección.

1.3.1.5 Factores que influyen en la inactivación microbiana por el calor

Los factores ambientales que afectan a la resistencia microbiana frente al calor son muchos y de muy diversa naturaleza. Sin embargo, para simplificar su estudio, tradicionalmente se han clasificado en función de su momento de actuación en: previos, simultáneos y posteriores al tratamiento térmico.

Factores que afectan antes del tratamiento

La dotación genética inherente a cada microorganismo hace que éste muestre una determinada resistencia al calor, existiendo diferencias no sólo entre especies sino entre cepas (Whiting y Golden, 2002; Cebrián y col., 2007; Lianou y Koutsoumanis, 2013). Sin embargo, también hay ciertos factores ambientales que pueden modificar la expresión génica celular dando lugar a variaciones en su termorresistencia específica. A continuación se detallan aquellos factores que resultan de especial interés, principalmente por la frecuencia en que aparecen en la bibliografía y la magnitud de los cambios generados por su efecto.

- Fase de crecimiento. Las células en fase exponencial de crecimiento presentan, en general, una menor resistencia frente al calor que las que se hallan en fase estacionaria. Numerosos autores han demostrado este efecto en diferentes especies microbianas, como por ejemplo: *Enterococcus faecium* (Martínez y col., 2003), *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* (Berney y col., 2006), *Listeria innocua* (Miller y col., 2009), *Listeria monocytogenes* (Pagán, 1997; McMahon y col., 2000; Chhabra y col., 2002), *Salmonella senftenberg* (Ng y col., 1969; Doyle y Mazzotta, 2000), *Yersinia enterocolitica* (Pagán, 1997; McMahon y col., 2000), *Staphylococcus aureus* (Cebrián, 2009) y *Aeromonas hydrophila* (Pagán, 1997).

Algunas de las causas propuestas para explicar esta diferencia en la termorresistencia son: cambios en la composición de los lípidos de membrana o en la concentración de iones de magnesio (Tomlins y col., 1982; Beney y Gervais, 2001); cambios en la presión osmótica celular y en la velocidad de las reacciones enzimáticas (Hansen y Riemann, 1963); o cambios morfológicos como consecuencia de la entrada en fase estacionaria (Beuchat, 1978).

- Temperatura de crecimiento. En los textos generales se suele afirmar que los microorganismos termófilos presentan una mayor resistencia al calor que los mesófilos y éstos, a su vez, que los psicrófilos (Russell, 1982; Jay, 1998). Estas diferencias en la

termorresistencia entre estos grupos pueden deberse a diferencias en su dotación génica. Sin embargo, no solo existen diferencias entre los diferentes grupos microbianos, sino también en una única cepa cultivada a distintas temperaturas. En general son las resistentes las células obtenidas a mayores temperaturas. Las causas de este efecto pueden ser: cambios en la proporción de ácidos grasos de la membrana o de la composición proteica, lo que permite a la célula regular su permeabilidad (Stintzi, 2003; Álvarez-Ordóñez y col., 2008; 2009); o las modificaciones en algunos componentes celulares, como el ADN o los ribosomas, que presentan una mayor termoestabilidad en células cultivadas a mayor temperatura (Pace y Campbell, 1967; Adamcık y col., 2002).

- Composición y características del medio de crecimiento. Aunque este factor ha sido menos estudiado la mayoría de los autores opinan que la termorresistencia aumenta con la complejidad del medio (Doyle y Mazzotta, 2000; Syamaladevi y col., 2016). Sin embargo, algunos resultados son, al menos hasta cierto punto, contradictorios y, en nuestra opinión, no se pueden extraer por el momento conclusiones definitivas al respecto. Por otra parte, también las condiciones físico-químicas del medio de cultivo parecen afectar a la termorresistencia. Shebuski y col. (2000) demostraron que la disminución de la actividad de agua del medio de crecimiento ejercía un efecto protector frente al calor. Del mismo modo, Ryu y Beuchat (1998), Chhabra y col. (2002), Fernández (2007) y Álvarez-Ordóñez y col. (2008) observaron que la reducción del pH del medio de crecimiento conducía a un aumento de la resistencia al calor de diferentes microorganismos, aunque también parecía depender del tipo de acidificante utilizado. Además, la presencia de determinadas concentraciones de solutos como NaCl (Aryani y col., 2015; Montanari y col., 2015) o glucosa (Wilde y col., 2000; Velliou y col., 2011; Syamaladevi y col., 2016) también modifican la termorresistencia. Por todo ello, la mayor o menor resistencia al calor parece deberse al desencadenamiento de mecanismos inespecíficos de adaptación microbiana al estrés.

- Fenómenos de adaptación al estrés. La exposición de los microorganismos a temperaturas subletales y otros estreses pueden ser origen de variaciones en la termorresistencia. Así, la adaptación del microorganismo a un pH, temperatura o actividad de agua que se alejan de los valores óptimos sin llegar a ser letales, inducen en la bacteria una respuesta adaptativa que se traduce en una mayor tolerancia frente a estreses posteriores que pueden ser de igual o diferente naturaleza (Lou y Yousef, 1996; Hill y col., 2002).

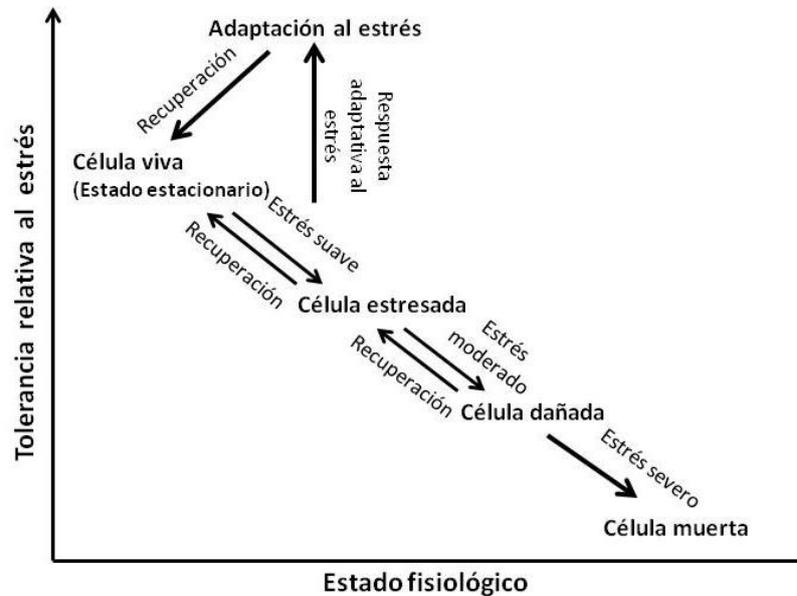


Figura 1.18. Interrelación propuesta dentro del estado fisiológico de la célula microbiana sujeta a diferentes estreses (adaptada de Yousef y Juneja, 2002).

Diversos autores estudiaron el efecto de la adaptación a la acidez previamente al tratamiento térmico (Farber y Pagotto, 1992; Leenanon y Drake, 2001; Mazzotta, 2001; Skandamis y col., 2008) y observaron que el estrés ácido inducía la producción de proteínas del estrés encargadas de la protección celular frente al calor. También el choque osmótico o la adaptación microbiana por cambio en la actividad de agua del medio de crecimiento induce una mayor resistencia a un tratamiento térmico posterior (Peña-Meléndez y col., 2014). Por otro lado, Lou y Yousef (1996) observaron que la adaptación de las células de *Listeria monocytogenes* al H_2O_2 aumentaba la resistencia al calor, y que el efecto dependía de la concentración del compuesto. Estos mismos autores sugirieron que la adaptación de *L. monocytogenes* al H_2O_2 conllevaba la activación de proteínas de respuesta al estrés oxidativo, reguladas por el factor OxyR, como la catalasa, la alquil hidroperóxido reductasa y la glutatión reductasa, entre otras. Por último, otros autores han observado que al exponer diferentes microorganismos a temperaturas subletales por encima de la óptima de crecimiento se ponen en marcha una serie de mecanismos que les permiten sobrevivir a condiciones medioambientales más extremas, como puede ser un tratamiento a alta temperatura. Esta respuesta se denomina “al choque térmico”, ya que ocurre cuando se somete a las células a temperaturas elevadas durante su crecimiento. Van der Veen y col. (2007) observaron que la mayoría de los genes activados por el choque térmico codificaban chaperonas o proteasas que, posteriormente, podían proteger otras proteínas y enzimas de su desnaturalización o daño. Las envolturas celulares albergan una parte importante de las HSP (Heat Shock Protein), por lo que

muy probablemente el mantenimiento de su estructura y funcionalidad es uno de los principales efectos fisiológicos de la respuesta al choque térmico (Nonaka y col., 2006). Por otra parte, algunos autores destacan que el papel de los ribosomas en el desarrollo de la resistencia frente al calor puede ser crucial, ya que se les atribuye un papel termosensor capaz de inducir la respuesta al choque térmico (Schumann, 2007). También se ha descrito que algunos genes implicados en la respuesta SOS, inducida por la aparición de daños en el ADN, incrementan su expresión como consecuencia del choque térmico en bacterias como *E. coli* o *L. monocytogenes* (Nonaka y col., 2006; Van der Veen y col., 2007). Por todo ello, desde un punto de vista práctico, la exposición a condiciones de estrés de intensidad subletal durante el procesado de los alimentos debería ser evitada siempre que sea posible.

Factores que afectan durante el tratamiento

No sólo las condiciones de crecimiento afectan a la posterior resistencia térmica de los microorganismos, sino que células cultivadas en idénticas condiciones pueden mostrar una termorresistencia muy diferente en medios de tratamiento de distinta naturaleza. De igual manera que en el apartado anterior, incluiremos a continuación aquellos factores de mayor influencia.

- pH del medio de tratamiento. La mayoría de las investigaciones concluyen que las células son más termorresistentes a un pH próximo a la neutralidad (Jay, 1998), aunque se han descrito excepciones (Mañas y col., 2003; Hassani y col., 2006a). Normalmente se ha considerado que pHs por encima y por debajo del óptimo conllevan una disminución de la termorresistencia, pero la mayoría de los estudios solo comparan dos o tres valores de pH, lo que hace difícil determinar el óptimo (Condón y col., 1992; Palop y col., 1996; Chiruta y col., 1997; Sagarzazu y col., 2010). Además, el tipo de ácido también determina el pH de máxima resistencia al calor (Fernández y col., 2009). La razón por la que las células son más sensibles cuando son tratadas a pH ácido no está clara, y en la actualidad el mecanismo o mecanismos implicados no son del todo conocidos. Sin embargo, se sospecha que durante el tratamiento, las células vegetativas sufren una rápida acidificación del citoplasma que lleva a una pérdida de la homeostasis celular, a la desnaturalización proteica y a la alteración de algunas estructuras que finalmente conducen a la inactivación celular.

- a_w del medio de tratamiento. Un descenso en la a_w del medio de tratamiento aumenta notablemente los valores D_t de los microorganismos. El tipo de soluto usado para disminuir la actividad de agua es, asimismo, importante. En cualquier caso, el incremento en la resistencia al calor es de gran magnitud; por ejemplo, un descenso en la actividad de agua desde 0,98 a

INTRODUCCIÓN

0,83 con sacarosa causa un aumento de 100 veces en el valor D_t de *Salmonella typhimurium* (Sumner y col., 1991). El mecanismo involucrado en esta protección no está del todo claro, aunque es un hecho bien conocido que las células suspendidas en medios de elevada osmolaridad experimentan el fenómeno de plasmólisis, es decir la salida rápida de agua intracelular que conduce a la deshidratación parcial del citoplasma (Gould, 1989; Álvarez, 2000; Smelt y col., 2002); y que la estabilidad térmica de las proteínas y enzimas aumenta en medios de baja actividad de agua, lo que se ha asociado con la formación de enlaces intramoleculares con el consiguiente aumento de la resistencia a la desnaturalización (Ng, 1982; Álvarez, 2000). No obstante, también la adición al medio de tratamiento de solutos permeables como el glicerol protege a las células bacterianas frente a la acción del calor, como demostró Serrano (2015) en diferentes microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella senftenberg 775W* y *Listeria monocytogenes*.

- Composición del medio de tratamiento. Aparte del efecto intrínseco del pH y de la actividad de agua, los componentes del medio de tratamiento también ejercen un efecto en la supervivencia celular frente al calor. Generalmente se asume que los medios complejos protegen a las células de la inactivación por calor (Stringer y col., 2000; Mañas y col., 2001; Hassani y col., 2006a), pero también existen datos que parecen demostrar lo contrario (Palop y col., 2000). Aunque son muchos los esfuerzos realizados para estudiar la influencia que el medio de tratamiento tiene sobre la termorresistencia microbiana, la complejidad de las matrices alimentarias dificulta la determinación de los componentes y mecanismos implicados. Se ha demostrado que la adición de cloruro sódico u otras sales que aportan cationes divalentes al medio de tratamiento, suelen aumentar la termorresistencia microbiana (Russell, 1982; Mañas y col., 2001). Por el contrario, la adición de fosfatos, polifosfatos o nitritos reduce la resistencia frente al calor (Tomlins y Ordal, 1976).

Tradicionalmente se ha asumido que la presencia de grasa aumenta la resistencia frente al calor y el efecto se ha asociado con la baja actividad de agua en puntos localizados del alimento (Jay, 1998). Otros componentes como el etanol (Casadei y col., 2001) o diversos antimicrobianos naturales, como los aceites esenciales y la nisina (Boziaris y col., 1998; Espina y col., 2012) disminuyen la termorresistencia de las bacterias, pero su modo de acción todavía no ha sido aclarado.

- Potencial redox del medio de tratamiento. El potencial redox es un factor ambiental que influye en el metabolismo microbiano y, seguramente por ello, en su resistencia al calor (Masson y col., 1997; Bagramyan y col., 2000; Riondet y col., 2000). Algunos autores han observado que un potencial redox positivo aumenta la expresión de diferentes enzimas (Unden y col., 1990). Otros han descrito la importancia en el proceso bioenergético celular del

componente Δpmf (*proton motive force*), que se modifica en respuesta a un bajo potencial redox (Riondet y col., 1999). Aunque estos cambios pueden afectar a la resistencia al calor de los microorganismos todavía no se ha demostrado. Ugborogho y Ingham (1994) concluyeron que el valor D_t de *Staphylococcus aureus* aumentaba al disminuir el potencial redox. George y Peck (1998) observaron este mismo efecto en *Escherichia coli* O157:H7. Además, Riondet y col. (2000) estudiaron el efecto combinado del potencial redox y el pH en la resistencia al calor de *E. coli* y en su recuperación. Estos autores observaron que a pH 6,0 no se producía un efecto significativo, mientras que a pH 5,0 y a pH 7,0 la resistencia máxima se alcanzaba en condiciones oxidantes y que disminuía en condiciones reductoras. Por último, Ignatova y col. (2008) observaron que en aquellos medios que poseían un potencial redox positivo la inactivación de *Listeria monocytogenes* era menor. A su vez, estos autores también describieron un efecto combinado de pH y potencial redox, pues observaron una mayor inactivación por calor cuando el medio presentaba un pH ácido (5,0) y un potencial redox negativo. Como se puede deducir de todos estos resultados, las conclusiones obtenidas por los diferentes autores son contradictorias, ya que unos autores han observado un efecto protector en medios de bajo potencial redox, mientras que en otros han observado lo contrario. Estas diferencias podrían ser debidas a la interferencia de otros factores como el pH, la actividad de agua, la presencia de diversos componentes en el medio de tratamiento, e incluso de las condiciones de crecimiento del microorganismo objeto de estudio.

No existen datos suficientes que permitan emitir una hipótesis sólida sobre el mecanismo a través del cual el potencial de redox del medio de tratamiento pueda afectar a la termorresistencia microbiana. Quizá la mayor eficacia del calor en determinadas condiciones de tratamiento se deba a que favorece la formación de diversas especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, las cuales, como ya se sabe, causan daños en las diferentes estructuras celulares, e incluso podrían dificultar su reparación bajo condiciones adversas.

Factores que afectan después del tratamiento

Los factores incluidos en este grupo, más que afectar a la termorresistencia intrínseca de los microorganismos actuaría sobre la estimación de los valores D_t por efecto del daño térmico subletal (Mackey, 2000). Dada la acción multi-diana del calor, es razonable esperar daños subletales de naturaleza y severidad muy diversa dentro de la población tratada. De hecho, diferentes autores han observado daños subletales en prácticamente todos los componentes celulares.

INTRODUCCIÓN

Obviamente, las condiciones de recuperación tras el tratamiento determinan si efectivamente el daño subletal causado puede repararse o no, y además podrán cambiar el perfil de las gráficas de supervivencia y, por tanto, los tiempos de tratamiento estimados. Los factores más importantes al respecto son el tiempo y la temperatura de incubación, la composición del medio de recuperación y sus características físico-químicas.

- Tiempo y temperatura de incubación. Generalmente se considera que tiempos largos de incubación permiten a las células dañadas reparar más daños térmicos (Tomlins y Ordal, 1976; Mackey, 2000). En cuanto a la temperatura, muchos autores están de acuerdo en que la temperatura óptima de recuperación de las células dañadas es, en general, menor que la de crecimiento (Mackey, 2000). La razón de este efecto es desconocida, aunque algunos autores han propuesto que tras el tratamiento térmico se producirían desacoplamiento de determinadas rutas metabólicas y que las bajas temperaturas limitarían la velocidad de las reacciones químicas facilitando, de esta manera, la correcta coordinación del metabolismo microbiano (Beuchat y Lechowich, 1968), y/o permitirían un equilibrio más favorable entre los procesos de reparación y los procesos degenerativos que conducen a la muerte celular (Mackey y col., 1994).

- Composición del medio de recuperación. Las células dañadas son nutritivamente más exigentes y, a su vez, más sensibles a la presencia de compuestos tóxicos en el medio de recuperación (Mackey, 2000; Stringer y col., 2000), de manera que el equilibrio entre ambos factores determinará la supervivencia tras el tratamiento. Por lo tanto, medios más complejos no siempre favorecen la recuperación de los daños. De hecho, Gomez y col. (1973) demostraron una mejor recuperación de *Salmonella typhimurium* tratada por calor cuando se recuperaba en un medio simple, en relación a un medio complejo. Se han obtenido resultados similares con *S. senftenberg* y algunos autores opinan que este hecho se debe a la presencia de especies reactivas del oxígeno en los medios ricos de recuperación. Estas sustancias se podrían producir por la oxidación de determinados componentes durante la esterilización a altas temperaturas (Mackey, 2000; Stephens y col., 2000; Wesche y col., 2009).

Entre los compuestos con demostrada influencia en la recuperación celular se encuentran numerosos **antimicrobianos** (Russell, 1982; Tsuchido y col., 1985; Pagán y col., 1999), como antibióticos y bacteriocinas, que pueden interferir en la reparación de diferentes estructuras. Así, por ejemplo, la presencia de nisina, que desestabiliza la membrana, o la presencia de otros compuestos como los aceites esenciales o el ácido sórbico interferirían en los procesos de recuperación, añadiendo un margen extra de seguridad a ciertos procesos térmicos aplicados a los alimentos (Esteban y col., 2013).

Otro componente ampliamente estudiado ha sido el **cloruro sódico** (Pagán, 1997; Mañas, 1999; Mackey, 2000; Chambliss y col., 2006; Arroyo y col., 2012; Espina y col., 2012) que, de hecho, se utiliza en los medios de recuperación en el laboratorio como indicador de la presencia de daños inespecíficos en la membrana citoplasmática. No obstante, aunque ha sido ampliamente utilizado, actualmente no se conoce con certeza su modo de acción (Cebrián y col., 2015).

También han sido varios los investigadores que han estudiado la **influencia del pH** del medio de recuperación en la supervivencia microbiana al calor (Wuytack y col., 2003; Noriega y col., 2013). Se ha observado que el descenso del pH del medio de recuperación conlleva un descenso en los valores D_t estimados (Moats y col., 1971a; Martínez, 2002; Wuytack y col., 2003). Posiblemente las alteraciones de la permeabilidad de las membranas y de las bombas de transporte de hidrogeniones por acción del calor dificulten el mantenimiento del pH intracitoplasmático. En el caso de los esporos bacterianos, Palop y col. (1996) demostraron que los tratamientos térmicos elevaban el pH mínimo de germinación, lo que también justificaría un menor recuento en medios más ácidos.

El efecto de la **actividad de agua** del medio de recuperación ha sido mucho menos estudiado. Los escasos datos existentes parecen demostrar que la disminución de la a_w del medio de recuperación reduce el recuento obtenido tras el tratamiento térmico, tanto en *E. coli* (Clavero y Beuchat, 1996) como en *S. aureus* y *Salmonella* (Horner y Anagnostopoulos, 1975).

Ejerciendo la acción contraria a los antimicrobianos se encuentran los compuestos **antioxidantes y secuestrantes de ROS**. La adición de diferentes compuestos secuestradores de especies reactivas del oxígeno o antioxidantes, como catalasa, peroxidasa, SOD, manitol, piruvato, histidina, cisteína o glutatión, se logra una mayor recuperación celular tras el tratamiento térmico. Estos beneficios se han demostrado en diversos microorganismos, incluyendo *E. coli*, *C. jejuni*, *S. enteritidis*, *S. aureus* y *L. monocytogenes* (Stephens y col., 2000; Stephens y Mackey, 2003), si bien estos compuestos deben estar presentes cuando los componentes tóxicos sobre los que actúan están siendo generados (Rayman y col., 1978; Humphrey, 1988; Smith y Dell, 1990; Mackey, 2000).

Además, como se ha mencionado anteriormente, la recuperación en condiciones de **anaerobiosis** también permite obtener valores D_t mayores para microorganismos como *E. coli*, *L. monocytogenes* o *S. aureus*, posiblemente debido a la existencia de desequilibrios oxidativos tras el tratamiento térmico (Ugborogho y Ingham, 1994; Blackburn y col., 1997; George y Peck, 1998). El tratamiento con calor podría incrementar los niveles de estrés oxidativo intracelular por diversas vías, por ejemplo, por la inactivación térmica de enzimas detoxificantes de ROS

INTRODUCCIÓN

(catalasas, superóxido dismutasa, alquil-hidroperoxidasa), por la pérdida de importantes tioles reducidos (glutati6n) a trav6s de una membrana permeabilizada, por la liberaci6n de hierro libre intracitoplasmático derivada de la desnaturalizaci6n de prote6nas fijadoras espec6ficas, o por la alteraci6n del funcionamiento normal de la cadena de transporte de electrones con el subsecuente aumento de la producci6n interna de ROS, entre otras posibilidades.

1.3.2 Altas presiones hidrostáticas

1.3.2.1 Introducción: definición, evolución histórica y parámetros de tratamiento.

Esta tecnología, también llamada Pascalización, “High Pressure Processing” (HHP), “High Hydrostatic Pressure” (HHP) o “Ultra High Pressure (UHP) Processing”, consiste básicamente en someter a los alimentos a presiones comprendidas entre 100 y 900 MPa durante periodos de tiempo que generalmente se encuentran entre 1 y 30 min. En la industria alimentaria las presiones utilizadas habitualmente se encuentran comprendidas en el rango de 400 a 600 MPa durante tiempos de 1 a 10 minutos (Smelt, 1998; San Martín y col., 2002; Raso y Barbosa-Cánovas, 2003; Mañas y Pagán, 2005; Patterson, 2005).

A pesar de ser considerada una nueva tecnología para la conservación de los alimentos, la utilización de presión en la conservación de los alimentos se comenzó ya a estudiar en el siglo XIX. Hite (1899) fue el primero en investigar su uso en alimentos, ya que intentó esterilizar leche mediante presurización. Este trabajo fue el primero que demostró la reducción de la población microbiana mediante la aplicación de altas presiones. Sin embargo, no fue hasta principios de la década de los noventa cuando esta tecnología se empezó a utilizar comercialmente. En la actualidad su principal aplicación es prolongar la vida útil de los alimentos, aunque gradualmente se han ido proponiendo otras aplicaciones, como acelerar procesos de difusión de solutos, mejorar los procesos de congelación-descongelación o conseguir determinadas modificaciones en la textura debido a cambios en las proteínas y otras macromoléculas (San Martín y col., 2002).

Gracias a su capacidad para inactivar microorganismos en su forma vegetativa, tanto patógenos como alterantes, esta tecnología ha sido considerada como una posible alternativa a los métodos tradicionales de conservación de los alimentos (Patterson, 2005). Sin embargo, la aplicación de esta tecnología de forma generalizada se ve comprometida por su incapacidad para inactivar los esporos bacterianos (Smelt, 1998; Reddy y col., 1999; Patterson, 2005). Actualmente se están desarrollando numerosos estudios con el fin de aumentar la eficacia letal de las APH sobre los esporos. Algunos ejemplos son la combinación de APH con calor o con radiaciones ionizantes, entre otras opciones.

Los **parámetros de tratamiento** más importantes a controlar en un tratamiento por APH son:

INTRODUCCIÓN

- Presión y tiempo de tratamiento. La presión de tratamiento no se puede alcanzar de manera instantánea, de forma análoga a lo que ocurre en determinados tratamientos térmicos con la temperatura. Por lo tanto, el tiempo de tratamiento a presión constante será aquel comprendido entre el final de la compresión y el inicio de la descompresión, siendo este último tiempo generalmente más corto que el de la propia compresión (Figura 1.19).

A nivel industrial, y para maximizar la productividad y economía del proceso, se tiende a aplicar tratamientos de corta duración (< 10 min) a presiones comprendidas entre 400-700 MPa (Balasubramaniam y col., 2004). Los efectos del tratamiento, tanto a nivel industrial como de laboratorio, podrían verse afectados por los fenómenos adaptativos e inactivantes que puedan ocurrir en las células microbianas durante estos periodos de compresión y descompresión, en los que se aplican presiones de intensidad subletal y letal.

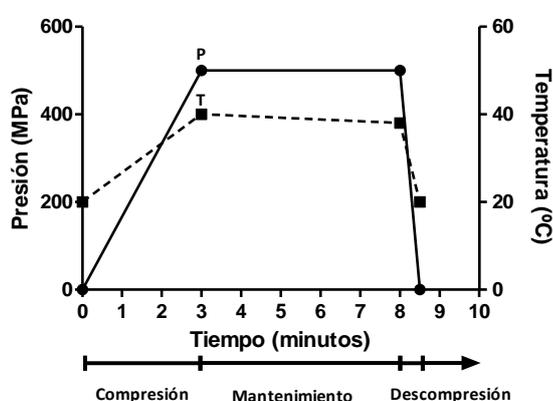


Figura 1.19. Ejemplo típico de la evolución de la presión y de la temperatura debido a la compresión por altas presiones hidrostáticas.

- Temperatura de tratamiento. Durante el procesado por APH la temperatura, tanto del producto como del fluido de compresión, aumenta debido al efecto termodinámico de la compresión (calentamiento adiabático) (Ting y col., 2002). El aumento en la temperatura en el fluido compresor dependerá principalmente de su calor específico, viscosidad y compresibilidad. El agua, por ejemplo, aumenta la temperatura aproximadamente 3°C cada 100 MPa, pero, en cambio, el aceite de silicona aumenta 20°C. Por otro lado, la temperatura final del producto dependerá de la temperatura inicial, de su composición y de su capacidad de compresión. Así, dependiendo del alimento, el incremento de temperatura varía entre los 2 y los 9°C por cada 100 MPa. Además, si el ritmo de calentamiento bajo presión del fluido compresor y del alimento son diferentes pueden existir gradientes térmicos dentro de la cámara de tratamiento (Balasubramaniam y Balasubramaniam, 2003). Para contrarrestar este efecto los equipos de APH suelen incluir circuitos de termostatación para el control de la temperatura durante el proceso.

- Tipo de tratamiento. Los tratamientos por APH se pueden aplicar en un solo ciclo, o bien sometiendo al alimento a ciclos repetidos de compresión-mantenimiento-descompresión. Diferentes estudios han demostrado que este segundo tipo de tratamiento presenta ventajas en cuanto a su capacidad de inactivación microbiana (Hayakawa y col., 1994; Palou y col., 1998), aunque también encarece y ralentiza el proceso debido al tiempo y energía invertidos en las fases de compresión y descompresión.

1.3.2.2 Eficacia letal sobre diferentes microorganismos

En general los microorganismos que presentan una mayor resistencia al calor también la presentan a las altas presiones, pero hay numerosas excepciones. Además, aunque se han realizado numerosos trabajos de investigación, al ser las cepas y las condiciones de tratamiento diferentes, la comparación directa de los resultados es muy complicada. Actualmente se asume que las células vegetativas de las bacterias, los mohos y las levaduras resultan eficazmente inactivadas por esta tecnología, mientras que los esporos bacterianos se muestran muy resistentes (Smelt, 1998; San Martín y col., 2002; Mañas y Pagán, 2005; Patterson, 2005).

Tabla 1.2. Resistencia aproximada de las diferentes especies microbianas vegetativas frente a las altas presiones hidrostáticas (adaptada de Smelt, 1998).

	Ciclos logarítmicos de inactivación (15 min)			
	300 MPa	400 MPa	500 MPa	600 MPa
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2->6			
<i>Byssochlamys nivea</i>	>6			
<i>Aeromonas hydrophila</i>	>6			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>6			
<i>Campylobacter</i>	>6			
<i>Salmonella</i> spp.	1-4,5			
<i>Yersinia enterocolitica</i>	>6			
<i>Escherichia coli</i>	1-2			
<i>Staphylococcus aureus</i>		0,2	1,9	2,1
<i>Listeria monocytogenes</i>		1-3	>6	

En la tabla 1.2 se presentan valores típicos de los niveles de inactivación conseguidos sobre diversas **especies vegetativas**. Como se puede deducir, tratamientos medios, es decir tratamientos entre 300 y 600 MPa, son efectivos para la inactivación de la mayoría de las especies (San Martín y col., 2002; Smelt y col., 2002). Además, de manera general, las bacterias Gram-positivas tienden a ser más resistentes a la presión que las bacterias Gram-negativas. No obstante, existen importantes variaciones intraespecíficas que invalidan estas observaciones generales. Así, en *E. coli* se han observado diferencias de hasta 6-8 ciclos de inactivación, en

INTRODUCCIÓN

función de la cepa estudiada (Benito y col., 1999). Asimismo, algunas cepas de este género de la serovariedad O157:H7 presentan una resistencia muy superior al resto de bacterias vegetativas (Patterson y col., 1995). Estas diferencias entre cepas de la misma especie también han sido observadas en *Salmonella* (Sherry y col., 2004) y en *S. aureus* (Cebrián y col., 2010).

Por lo general, los **mohos y levaduras** son sensibles a la presión, mostrando una resistencia similar a la de las células vegetativas (Tabla 1.2) (Butz y col., 1996; Palou y col., 1998; O'Reilly y col., 2000). Por ello esta tecnología podría ser una interesante alternativa para el tratamiento de productos ácidos, como los zumos de frutas, donde la germinación de los esporos es improbable. Sin embargo, pueden ser necesarios tratamientos a presiones más elevadas para la inactivación de ascosporas (Butz y col., 1996), micotoxinas (Bruna y col., 1997) y otras toxinas bacterianas (Margosch y col., 2005; López-Pedemonte y col., 2007).

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, uno de los mayores problemas que presenta esta tecnología es su limitada capacidad para inactivar los **esporos bacterianos** y algunas ascosporas de los mohos (Tabla 1.3). Su resistencia es tal que se han documentado cepas de *Bacillus* y *Clostridium* capaces de resistir tratamientos a presiones superiores a 1000 MPa a 25°C (San Martín y col., 2002). Esta gran barorresistencia se ha relacionado con el estado deshidratado, o incluso vítreo, del protoplasto del espora. Sin embargo, presiones relativamente bajas, 100-200 MPa, activan los receptores de la germinación del espora induciendo su germinación. Por ello, se ha propuesto un tratamiento en varias etapas para mejorar el efecto letal de las altas presiones (Heinz y Knorr, 2001; Setlow, 2003; Reineke y col., 2013). No obstante, este tratamiento tiene una eficacia variable. Además parece que una pequeña proporción de esporos siempre permanece sin germinar (Reineke y col., 2013).

Tabla 1.3. Efecto de las altas presiones hidrostáticas en la supervivencia de diferentes esporos y ascosporas fúngicas.

Microorganismo	Medio de tratamiento	Condiciones de tratamiento	Ciclos de inactivación	Referencia
<i>B. licheniformis</i>		981 MPa/5°C/40min	<1	Nakayama y col., 1996
<i>B. subtilis</i>		588 MPa/10°C/10min	<1	
<i>B. stearothermophilis</i>				
<i>Clostridium botulinum</i> (Tipo E)	Tampón Sorensen (pH 7.0)	827 MPa/35°C/5min 827 MPa/50°C/5min	<1 5	Reddy y col., 1999
<i>Clostridium sporogenes</i>		400 MPa/60°C/30min	<3	Mills y col., 1998
<i>Clostridium sporogenes</i>	Pechuga de pollo	680 MPa/80°C/20min	2	Crawford y col., 1996
<i>Clostridium sporogenes</i>			>5	Wilson y Baker, 2001
<i>B. subtilis</i>	Emulsión de carne	621 MPa/98°C/5min	>9	
<i>B. stearothermophilis</i>			>10	
<i>Byssochlamys nivea</i> (ascosporas)	Zumo de uva Mermelada (a_w 0.84)	700 MPa/70°C/30min	4 <1	Butz y col., 1996

Otras alternativas para la inactivación de estas formas de resistencia son la aplicación simultánea o sucesiva de altas presiones y calor, irradiación, antimicrobianos u otros agentes de conservación de los alimentos, constituyendo lo que se denominan procesos combinados (Waites y Bayliss, 1984; Reineke y col., 2013). A día de hoy solo la combinación de las APH con el calor es industrialmente viable y constituye una alternativa real para la esterilización de alimentos poco ácidos. Este efecto se atribuye a los efectos combinados de la desnaturalización proteica y de la inactivación enzimática por el calor y la agregación proteica producida por la presión (Rodríguez y col., 2004).

1.3.2.3 Mecanismos de inactivación por APH. Dianas celulares

Las altas presiones hidrostáticas se consideran, al igual que el calor, una tecnología capaz de actuar sobre diversos componentes celulares de modo simultáneo. Aunque no se conoce con certeza el mecanismo último de la muerte celular por APH, la mayoría de los autores coinciden en que la inactivación microbiana es el resultado de una acción multi-diana, aunque la importancia relativa de las diferentes dianas pueden ser diferentes en las distintas especies y los diferentes estados fisiológicos (Mackey y Mañas, 2008). Dentro de los componentes alterados por las altas presiones se encuentran: las envolturas, el ADN, los ribosomas, el RNA, y diversas proteínas y enzimas.

Una de las principales estructuras afectadas es la **membrana celular** (Smelt, 1998; Pagán y Mackey, 2000; Ulmer y col., 2000; Mañas y Mackey, 2004). Se han descrito alteraciones estructurales, pérdida de componentes intracelulares e incapacidad para mantener la homeostasis intracitoplasmática (Farkas y Hoover, 2000; Charoenwong y col., 2011).

La composición lipídica de la membrana parece ejercer una gran influencia en la mayor o menor barorresistencia de los diferentes microorganismos. Casadei y col. (2002) han descrito que la resistencia a la presión está relacionada con la fluidez de la membrana y su composición en ácidos grasos, ya que las células con membranas más fluidas presentan una mayor resistencia. Algunos autores (Kato y Hayashi, 1999; Mackey y Mañas, 2008; Purushothaman y col., 2015) han sugerido un aumento del grado de ordenamiento de los lípidos, y un incremento en el grosor de las membranas bajo el efecto de las altas presiones. La bicapa lipídica pasaría de estado líquido cristalino a gel, lo que podría conducir a la formación de poros, resultando en una pérdida de funcionalidad. Asimismo, la observación microscópica ha permitido detectar áreas de engrosamiento, invaginaciones y presencia de vesículas en células que han sido presurizadas (Mañas y Mackey, 2004). Además, Tholozan y col. (2000) han

INTRODUCCIÓN

observado, mediante microscopía electrónica, alteraciones morfológicas en forma de hendiduras superficiales en *Salmonella typhimurium* tratada por APH. Las razones de estos fenómenos no son del todo conocidas. Beney y col. (1997) sugirieron que la formación de vesículas en los liposomas se debía a la diferente compresibilidad del agua, en la parte interior del liposoma, y de los fosfolípidos. Durante la fase de compresión los liposomas disminuirían de tamaño y el agua saldría por difusión pasiva, y durante la fase de descompresión la capa de fosfolípidos se expandiría súbitamente ocupando un volumen muy superior al inicial dando lugar a la formación de estas vesículas o proyecciones con objeto de estabilizar la relación superficie-volumen. No obstante, este mecanismo no ha sido demostrado en la membrana de células vivas.

Como consecuencia de la alteraciones de la membrana, diversos autores han observado una liberación al medio extracelular de componentes intracelulares como aminoácidos, proteínas, ADN, ARN, iones metálicos (K^+ , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ o Zn^{2+}) y ATP (Smelt y col., 1994; Perrier-Cornet y col., 1999; Ritz y col., 2001; Mañas y Mackey, 2004). Además de la alteración de la permeabilidad selectiva, el tratamiento por APH puede la pérdida de otras funciones asociadas a la membrana. Smelt y col. (1994) han descrito la pérdida de capacidad para mantener la homeostasis celular, lo que se ha achacado a la inactivación de la F_0F_1 ATPasa de membrana. Este fenómeno ha sido demostrado, posteriormente, por Wouters y col. (1998). Otros autores han demostrado que esta enzima no es esencial en algunas especies, como *E. coli*, pero su inactivación podría disminuir la cantidad de ATP disponible y afectar a otros fenómenos de reparación (Marquis y Bender, 1987; Harold y Maloney, 1996). Sea cual sea el mecanismo, diversos autores han demostrado que los tratamientos APH dificultan la capacidad de mantener el pH intracelular en condiciones de acidez (Pagán y Mackey, 2000; Tholozan y col., 2000; Kilimann y col., 2005), así como una pérdida de la capacidad de respuesta frente a un estrés osmótico tras el tratamiento térmico (Pagán y Mackey, 2000; Mañas y Mackey, 2004). En ningún caso ha sido posible establecer una relación matemática directa entre cualquiera de estos cambios y la inactivación celular para todos los tipos celulares y condiciones de tratamiento, si bien ha quedado demostrado que todos ellos se producen con mayor intensidad en las células más sensibles a las APH.

Los daños a la membrana también se han demostrado utilizando marcadores fluorescentes como el yoduro de propidio (Benito y col., 1999; Pagán y Mackey, 2000; Mañas y Mackey, 2004; Klotz y col., 2010; Charoenwong y col., 2011). Así, se ha demostrado que las células de *E. coli* en fase exponencial de crecimiento presentan alteraciones irreversibles en la integridad de la membrana citoplasmática ya que se permeabiliza al yoduro de propidio tras el

tratamiento (Pagán y Mackey, 2000). Charoenwong y col. (2011) achacan al factor sigma RpoS (σ^S), encargado de la respuesta general al estrés, la mayor resistencia a las altas presiones de las células en fase estacionaria de crecimiento. Estos autores observaron que las células de *E. coli* mutantes en el gen *rpoS*, presentaban una menor resistencia a los tratamientos por altas presiones y, además, eran incapaces de reparar los daños en la membrana tras el tratamiento. Asimismo, observaron que células mutantes en otro gen regulado por RpoS y relacionado con la composición de las envolturas, *cfa* (ciclopropano-graso-acil-fosfolípido sintasa), presentaban una mayor sensibilidad a las altas presiones.

Otros resultados indican que la permeabilización de las envolturas puede producirse incluso a presiones subletales, aunque posteriormente la membrana se reparaba (Black y col., 2005). También existen datos que demuestran que es posible que se produzca la muerte celular sin que la membrana pierda funcionalidad ni se produzca su permeabilización. Finalmente hay que destacar que durante la presurización se produce una permeabilización permanente en las células en fase exponencial, pero reversible en las células en fase estacionaria, más resistentes (Pagán y Mackey, 2000; Mañas y Mackey, 2004; Klotz y col., 2010). Basándose en esos datos, Mackey y Mañas (2008) proponen que la muerte celular por altas presiones podría estar relacionada con el grado de permeabilización de la membrana durante el tratamiento. Esta permeabilización podría provocar la pérdida de iones y otros componentes y desencadenar a su vez cambios celulares secundarios conducentes a la inactivación.

La **membrana externa** de las células Gram-negativas también se permeabiliza durante los tratamientos de APH. Esta permeabilización se ha detectado estudiando la salida de enzimas periplásmicas (Hauben y col., 1996; Gänzle y Vogel, 2001). Hauben y col. (1996) demostraron que, como en el caso de la membrana citoplasmática, esta permeabilización puede ser transitoria. Así, *E. coli* se sensibiliza frente a compuestos como la nisina o la lisozima durante la compresión, pero si estos antimicrobianos se añaden después del tratamiento pierden su eficacia bactericida. Por su parte, Ritz y col. (2001) demostraron la pérdida de proteínas de la membrana externa de *Salmonella*, que en algunos casos llegaba a ser casi total.

El hecho de que en algunos casos se hayan observado células inactivadas por altas presiones que presentan unas membranas funcionales, demuestra que existen otros componentes diana. Aunque la estructura del **ADN** es relativamente estable frente a este agente, se ha observado la condensación del nucleóide en células de *Salmonella*, *Listeria*, *Lactobacillus* o *E. coli* (Mackey y col., 1994; Wouters y col., 1998; Mañas y Mackey, 2004), además de un incremento en el superenrollamiento y alteraciones en los plásmidos. Los

INTRODUCCIÓN

procesos enzimáticos de replicación, que se alteran incluso a presiones tan bajas como 50 MPa, y los procesos de transcripción se ven también afectados tras estos tratamientos. Por otra parte, Chilton y col. (1997) observaron cierta degradación del ADN, fenómeno que proponen se debería a que el ADN entraría en contacto con endonucleasas capaces de romper su estructura. También se ha descrito que mutantes defectivos del gen *recA*, que participa en la reparación del ADN, *polA*, encargado de regular la actividad de la ADN polimerasa, y *soxS*, regulador de la unión transcripcional doble del ADN, son más sensibles al tratamiento por APH (Charoenwong y col., 2011). Aertsen y col. (2004a; 2005) observaron que un tratamiento por APH inducía una respuesta SOS ante la aparición de rupturas dobles de la cadena de ADN debido la activación de una enzima de restricción (Mmr). Es importante destacar que la respuesta SOS es inducida frecuentemente por la exposición a agentes químicos oxidantes. Todos los fenómenos que afectan al ADN tras los tratamientos de APH parecen ser reversibles y/o reparables por la maquinaria celular.

Otras estructuras afectadas por APH son los **ribosomas**. La disociación de las dos subunidades que lo forman ocurre a presiones de 70 MPa en *E. coli*, siendo este fenómeno reversible a presiones por debajo de 100 MPa. Niven y col. (1999) demostraron que la desnaturalización de los ribosomas, evaluada mediante calorimetría diferencial, ocurría en paralelo con la pérdida de la viabilidad celular en *E. coli*. Posteriormente, se observó el mismo efecto en *E. coli* y *S. aureus* (Alpas y col., 2003). Sin embargo, dado que las células tendían a inactivarse aun cuando los ribosomas eran capaces de recuperarse bajo condiciones óptimas, diversos autores indicaron que otros factores estaban implicados en la muerte de las células dañadas bajo presión (Niven y col., 1999; Mackey y Mañas, 2008). Estos autores sugirieron que tal vez la desestabilización de los ribosomas podría ser debida, al igual que ocurre durante los tratamientos térmicos, a la pérdida de Mg^{2+} de la célula como consecuencia de los daños a la membrana.

La **inactivación enzimática** y la **desnaturalización proteica** parecen ser otros factores importantes en la inactivación microbiana por APH. La tinción de las células tratadas con colorantes que se unen específicamente a las proteínas ha permitido demostrar la formación de agregados en el citoplasma celular (Mañas y Mackey, 2004; Mackey y Mañas, 2008; Govers y Aertsen, 2015; Gayán y col., 2017; Govers y col., 2017). Las proteínas agregadas podrían incluir a las proteínas ribosomales y otras citoplasmáticas, así como a diversas enzimas. Charoenwong y col. (2011) observaron una mayor sensibilidad a estos tratamientos de cepas mutantes en genes encargados de la síntesis de chaperonas (*ibpA* e *ibpB*). También se ha observado la inactivación de diversas enzimas como la fosfoglucomutasa y la aconitasa

(Simpson y Gilmour, 1997b), e incluso se ha propuesto a la ATPasa de membrana, como la principal diana del tratamiento por altas presiones (Smelt, 1998). La ARN polimerasa tanto de *E. coli* como de *Shewanella violacea* resulta inactivada a 150 MPa, aunque este es un fenómeno muy dependiente de la conformación de la enzima, que podría también clasificarse como un componente crítico. Pese al indudable efecto de las altas presiones sobre la integridad de enzimas y proteínas, todavía no se ha establecido una relación directa con la muerte celular. Los datos disponibles en bibliografía indican que la mayor parte de estos cambios de las proteínas son reversibles.

1.3.2.4 Cinética de inactivación por altas presiones hidrostáticas

En la mayoría de los casos las curvas de supervivencia frente a las altas presiones hidrostáticas presentar un perfil recto en los primeros 3-4 ciclos de inactivación (Moody y col., 2014; Serment-Moreno y col., 2014; Possas y col., 2017), pero cuando las curvas bajan más de ese nivel de inactivación suelen adquirir forma cóncava debido a la aparición de colas (Mañas y Pagán, 2005; Patterson, 2005; Moody y col., 2014). Este fenómeno, sin embargo, no es constante y depende tanto del microorganismo como de la presión, la temperatura y la composición del medio (Dogan y Erkmen, 2004; Yao y col., 2015).

El significado de estas colas no está claro, aunque generalmente se ha atribuido a la presencia de poblaciones con diferente resistencia (Humpheson y col., 1998) o a una distribución continua de las resistencias dentro de la población microbiana (Smelt y col., 2002). Ocasionalmente se ha descrito el aislamiento de clones barorresistentes, genéticamente diferentes a la población principal, tras el tratamiento con APH (Karatzas y Bennik, 2002; Aertsen y col., 2004b; Karatzas y col., 2007). También ha sido posible aislar mutantes barorresistentes tras la aplicación de varios ciclos de presurización y crecimiento de los supervivientes (Hauben y col., 1997; Vanlint y col., 2013; Marietou y col., 2015). Estos hechos ponen de manifiesto que la tasa de variabilidad y de mutación en relación con la resistencia a este agente es relativamente elevada.

Cualquiera que sea la razón, la presencia de colas es prácticamente una constante en las gráficas de supervivencia. Por ello, para modelizar estas gráficas se han propuesto diferentes modelos entre los que se encuentra el modelo “cuasi-químico”(Doona y col., 2005; Ross y col., 2005), modelos log-logísticos (Chen, 2007), modelos basados en la distribución de Weibull (Chen y Hoover, 2004; Chen, 2007; Silva, 2015), modelos basados en la ecuación de Gompertz o modelos basados en una cinética lineal modificada(Chen y Hoover, 2003). No obstante, a día

INTRODUCCIÓN

de hoy no existe un consenso sobre cuál es el modelo que mejor describe la cinética de inactivación por APH.

También se han propuesto modelos secundarios, como por ejemplo la utilización de un parámetro equivalente al valor z (Chen y Hoover, 2003; Serment-Moreno y col., 2014). El valor z_p se define como el incremento de presión necesario para reducir el valor D un ciclo logarítmico. Sin embargo, este parámetro parece ser adecuado sólo bajo condiciones isotermas y en un rango relativamente estrecho de temperaturas (Smelt y col., 2002). Por otra parte, como la temperatura es un parámetro muy importante en la eficacia del proceso, también se han propuesto modelos combinados de presión y temperatura (Sonoike y col., 1992; Buzrul y Alpas, 2004; Van Opstal y col., 2005).

Es importante destacar que también se han descrito frecuentemente hombros en curvas de supervivencia frente a las APH, fenómeno que parece depender del tipo de microorganismo y cepa (Cebrián y col., 2010), y que se ha relacionado con fenómenos de daño y recuperación celular.

1.3.2.5 Factores que influyen en la inactivación microbiana por APH

Factores que afectan antes del tratamiento

- Tipo y forma del microorganismo. La resistencia a las altas presiones de diversos tipos de microorganismos se han incluido en el apartado 1.3.2.2. De forma general se asume que la resistencia de las células procariotas excede la de las eucariotas, las bacterias Gram-positivas son más resistentes que las Gram-negativas, las pequeñas más que las grandes y las formas cocoides más que las bacilares (Cheftel, 1992; Ludwig y Schreck, 1997; Huang y col., 2014), aunque se han descrito numerosas excepciones a estas reglas generales (San Martín y col., 2002; Mañas y Pagán, 2005).

- Fase de crecimiento. Las células en fase de crecimiento exponencial presentan una mayor sensibilidad a los tratamientos por altas presiones (Isaacs y col., 1995; Benito y col., 1999; Pagán y Mackey, 2000; McClements y col., 2001; Mañas y Mackey, 2004; Huang y col., 2014). La mayor resistencia de las células en fase estacionaria podría deberse a las diferencias en la estructura de sus envolturas celulares, a un mayor grado de compactación del ADN y a la síntesis de proteínas capaces de proteger a las células sometidas a condiciones (Huang y col., 2014). Estos cambios parecen estar relacionados con la activación de los sistemas generales de resistencia al estrés.

- Exposición previa al estrés. Diversos autores han comprobado que la exposición al choque térmico provocaba un aumento en la resistencia a las altas presiones en *Escherichia*

coli (Pagán y Mackey, 2000; Aertsen y col., 2004a), *Listeria monocytogenes* (Hayman y col., 2007) y *Saccharomyces cerevisiae* (Iwahashi y col., 1997), y que la membrana de las estas células sometidas al choque térmico resultaba más estable frente a la permeabilización por la presión. Asimismo, la aplicación de los ADN microarrays ha permitido determinar los genes cuya expresión aumenta tras la exposición a este agente a intensidad subletal, en *E. coli* (Ishii y col., 2005; Malone y col., 2006) y en *L. monocytogenes* (Bowman y col., 2008). Las respuestas observadas fueron complejas, ya que el número de genes sobreexpresados ascendía a más de 600 en algunos casos y, además, no se expresaban los mismos en células en fase exponencial y estacionaria. En cualquier caso, y a modo de resumen, cabe destacar que entre los genes implicados se encuentran los que codifican factores sigma de resistencia general (*rpoS*, *rpoE*), proteínas de compactación del ADN (*dps*, *hns*) y un número importante de proteínas relacionadas con el mantenimiento del potencial redox (sistema tiorredoxina, catalasa, superóxido dismutasa y diversas proteínas implicadas en la quelación del hierro). Estos resultados sugieren que las defensas frente al estrés oxidativo son una pieza fundamental en la resistencia celular frente a las APH. Por último, la exposición de las células a un choque frío (temperaturas próximas a los 0°C durante períodos de tiempo del orden de las horas) también incrementa la resistencia a las APH, como se ha demostrado en *Listeria monocytogenes* (Wemekamp-Kamphuis y col., 2004), *Staphylococcus aureus* (Noma y Hayakawa, 2003), *Escherichia coli* (Aertsen y Michiels, 2008), *Saccharomyces cerevisiae* (Palhano y col., 2004) y *Lactobacillus sanfranciscensis* (Scheyhing y col., 2004). El choque frío provoca un descenso en la fluidez de la membrana e inhibe la traducción, al igual que lo hacen las altas presiones.

- Temperatura de crecimiento. Como se ha expuesto en capítulos anteriores, la temperatura de crecimiento determina la composición de los ácidos grasos de las envolturas celulares y, con ello, su fluidez. Dada la importancia de las membranas como estructura diana involucrada en la inactivación microbiana por APH, es previsible que cambios en la temperatura de crecimiento ejerzan un importante efecto en la resistencia a este agente. No obstante, pocos son los estudios encontrados acerca de la influencia de este factor.

Factores que afectan durante el tratamiento

- Presión y tiempo de tratamiento. Para la mayoría de las células vegetativas presiones de entre 100 y 200 MPa constituyen un umbral a partir del cual comienzan a inactivarse, aunque este valor depende del tipo de microorganismo. Por encima del valor umbral, un aumento de la presión de tratamiento conduce a un mayor efecto letal. Por otro lado, y salvo excepciones (fenómenos de hombro y de cola), un mayor tiempo de exposición conduce a una inactivación mayor.

INTRODUCCIÓN

- Temperatura de tratamiento. Temperaturas de tratamiento por encima o por debajo de la temperatura ambiente tienden a incrementar el nivel de inactivación microbiana por APH (López-Pedemonte y col., 2006). En el caso de los esporos bacterianos, la mayor letalidad de las APH a temperaturas de tratamiento elevadas se ha atribuido a la germinación de los esporos y su consecuente pérdida de la resistencia al calor. Las células vegetativas presentan su mayor resistencia a las APH a temperaturas de entre 20 y 30°C (Takahashi, 1992; Iwahashi y col., 1997; Simpson y Gilmour, 1997b; Casadei y col., 2001). El efecto de la temperatura de tratamiento parece estar relacionado con su acción sobre la fluidez de la membrana y la estabilidad proteica (Sonoike y col., 1992; Mackey y Mañas, 2008).

- Composición del medio de tratamiento. La composición del medio de tratamiento afecta a la resistencia a las APH de manera diferente a las distintas especies y cepas (Erkmen y Doğan, 2004; Patterson, 2005; Smiddy y col., 2005). Algunos componentes de los alimentos como las proteínas, los carbohidratos y los lípidos parecen ejercer cierto efecto protector (Simpson y Gilmour, 1997a). Diversos autores han demostrado el efecto baroprotector de diferentes compuestos como la grasa, los iones Na^+ y Li^+ , el Ca^{2+} , y la sacarosa a concentraciones que no modificaban apenas la a_w del medio (Michiels y col., 1996; Gervilla y col., 1997; Hauben y col., 1998; Van Opstal y col., 2003). Sin embargo, otros compuestos pueden ejercer el efecto contrario. Tal es el caso del NaCl y del ácido ascórbico, que ejercen un efecto sensibilizador (Jordan y col., 2001).

- pH del medio de tratamiento. En general, las células son más resistentes a pH neutro, y su resistencia a la presión disminuye cuando el pH aumentada o disminuye (Huang y col., 2014). Diversos autores han demostrado un efecto letal sinérgico entre la acidificación y las APH sobre células vegetativas procariotas (Mackey y col., 1995; Stewart y col., 1997; Koseki y Yamamoto, 2006). En cuanto a su influencia en la inactivación de esporos bacterianos, se ha descrito una mayor resistencia de los esporos en alimentos neutros que en alimentos ácidos (Islam y col., 2006; Vercammen y col., 2012).

- a_w del medio de tratamiento. El efecto de la actividad de agua del medio de tratamiento en la resistencia frente a las altas presiones hidrostáticas ha sido estudiado por diversos autores (Oxen y Knorr, 1993; Palou y col., 1997; Molina-Höppner, 2002; Van Opstal y col., 2003; Molina-Höppner y col., 2004; Smiddy y col., 2004; Aertsen y col., 2005). Al igual que ocurría en los tratamientos térmicos, existen importantes diferencias en los resultados en función del soluto utilizado. Así, la presencia de carbohidratos protege más a las células en comparación a las sales (Smelt, 1998; Molina-Höppner, 2002; Molina-Höppner y col., 2004; Koseki y Yamamoto, 2006), mientras que los monosacáridos y disacáridos lo hacen más que el

glicerol (Patterson, 2005). Este efecto protector ha sido atribuido a un mejor mantenimiento de la estabilidad de la membrana (Smiddy y col., 2004). En cuanto al efecto de la a_w los resultados parecen indicar que una baja actividad de agua ayuda a la protección de los esporos, pudiendo deberse a la inhibición de la germinación, efecto más acusado cuando la a_w se reduce mediante la adición de solutos iónicos, como NaCl, que cuando se añaden solutos no iónicos, como la sacarosa o la glucosa (Raso y col., 1998b; Sevenich y col., 2014).

Factores que afectan después del tratamiento

Numerosos autores han evidenciado la presencia de daño subletal tras la exposición de las células microbianas a las altas presiones (Alpas y col., 2000; Chilton y col., 2001; Pagán y col., 2001; Ritz y col., 2001). Los síntomas de daño subletal mas frecuentemente descritos son la sensibilidad a la sal, a los medios ácidos, a algunas sustancias antimicrobianas, a las sales biliares y al estrés oxidativo (Mackey, 2000; Chilton y col., 2001).

Las estructuras más estudiadas, debido a su gran susceptibilidad a las altas presiones, han sido las envolturas celulares. El estudio de los daños producidos en la membrana externa de *E. coli* se ha llevado a cabo mediante la adición de sales biliares y tetraciclinas. Chilton y col. (2001) demostraron cómo el daño a la membrana externa es reparado con facilidad por las células, de manera prácticamente automática tras la descompresión, y es metabólicamente poco exigente. Por otro lado, para estudiar el daño en la membrana citoplasmática diversos autores han adicionado NaCl al medio de recuperación o han realizado una incubación en medio ácido. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría en la membrana externa, la reparación de la membrana citoplasmática es mucho más costosa para las células, requiriendo síntesis de diversas macromoléculas (Chilton y col., 2001). Por otra parte, se ha descrito que el número de microorganismos supervivientes tras un tratamiento por APH es superior si la recuperación se lleva a cabo en condiciones de anaerobiosis (Aertsen y col., 2005) lo cual sugiere un componente oxidativo en la inactivación por altas presiones.

1.3.3 Pulsos eléctricos de alto voltaje

1.3.3.1 **Introducción: definición, evolución histórica y parámetros de tratamiento**

El tratamiento por pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV, o *PEF* del inglés *Pulsed Electric Fields*) consiste en la aplicación intermitente de campos eléctricos de alta intensidad (10-50 kV/cm) y corta duración (μ s) a un sustrato colocado entre dos electrodos (Barbosa-Cánovas y col., 1998). Estos tratamientos son capaces de inactivar microorganismos (Barbosa-Cánovas y Sepúlveda, 2005; Mañas y Pagán, 2005; Álvarez y col., 2006a; Barbosa-Cánovas y Altunakar, 2006; Pagán y Mañas, 2006) sin alterar la calidad de los alimentos, previniendo la pérdida de determinadas cualidades organolépticas o nutritivas especialmente apreciadas en determinados productos sensibles a la acción del calor (Grahl y Märkl, 1996; Hodgins y col., 2002).

Los primeros efectos de los pulsos eléctricos de alto voltaje sobre la viabilidad de los microorganismos fueron observados por Gossling (1960), cuando utilizó esta tecnología para inducir mutaciones en los microorganismos. Simultáneamente, el ingeniero alemán Doevenspeck (1960) describió las primeras aplicaciones prácticas de los pulsos eléctricos, que iban desde la inactivación microbiana hasta la mejora de la extracción de componentes intracelulares. Los primeros estudios sistemáticos sobre el efecto letal de los PEAV sobre diferentes microorganismos fueron realizados por los investigadores ingleses Sale y Hamilton (1967a,1967b). De sus estudios concluyeron que los campos eléctricos deterioraban la membrana celular, alterando su funcionalidad y provocando finalmente la muerte microbiana. En la década de 1980, un grupo liderado por Hülshager estudió la sensibilidad de diversos microorganismos a los PEAV y desarrollaron modelos matemáticos para describir la cinética de inactivación en función de la intensidad de campo eléctrico y del tiempo de tratamiento (Hülshager y Niemann, 1980; Hülshager y col., 1981,1983). Al comienzo de los años 1990 varios grupos de investigación comenzaron a investigar las potenciales aplicaciones de los PEAV en la industria alimentaria. A principios del siglo XXI, diversas empresas e institutos de investigación como ScandiNova Systems (Upsala, Suecia), DIL (Instituto Alemán de Tecnología Alimentaria, Quakenbrück, Alemania), KIT (Instituto Tecnológico de Karlsruhe, Karlsruhe, Alemania) y Diversified Technologies (Bedford, EE.UU.) comenzaron a desarrollar y comercializar prototipos de equipos generadores de PEAV. Este aspecto ha resultado clave para la evaluación de las potenciales aplicaciones de la tecnología en la industria alimentaria.

El esquema básico de un **equipo** utilizado para aplicar tratamientos por pulsos eléctricos de alto voltaje se muestra en la figura 1.20. Para generar pulsos eléctricos de alto voltaje es

precisa la carga de un condensador con corriente eléctrica continua y su descarga intermitente en una cámara de tratamiento. Por lo tanto, los componentes fundamentales de un equipo de generación de PEAV son: un generador de pulsos eléctricos de alto voltaje (constituido a su vez por un generador de corriente continua de alto voltaje, un condensador y un interruptor), una cámara de tratamiento y un sistema de control y toma de datos del proceso.

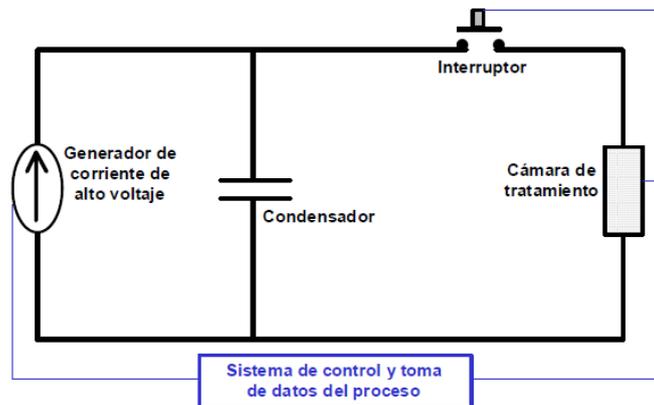


Figura 1.20. Esquema básico de un equipo para la aplicación de PEAV.

Los **parámetros** del tratamiento a destacar son:

- Intensidad del campo eléctrico. La intensidad del campo eléctrico aplicada (E) se define como la diferencia de potencial (V) existente entre los dos electrodos, donde se coloca el alimento, dividida por la distancia entre ellos (d):

$$E = \frac{V}{d}$$

Donde, siguiendo el Sistema Internacional de Unidades (S.I.), E se expresa en voltios divididos por metro (V/m); V , en voltios (V) y d en metros (m). No obstante, la intensidad del campo eléctrico suele expresarse, en la literatura, en kilovoltios dividido por centímetro (kV/cm).

Este es un parámetro fundamental del proceso ya que cuando se aumenta la intensidad del campo eléctrico se observa un mayor efecto sobre los microorganismos. Sin embargo, además de la intensidad del campo eléctrico hay que tener en cuenta su distribución dentro de la cámara, ya que una distribución heterogénea provoca una diferencia en el tratamiento recibido por las distintas partes del alimento y la aparición de pequeñas áreas donde la intensidad de campo es extremadamente elevada ("*hot-spots*") (Álvarez y col., 2006a).

INTRODUCCIÓN

- Forma del pulso. Existen fundamentalmente dos tipos de pulsos eléctricos (Figura 1.21), los pulsos de caída exponencial, en los cuales se produce un rápido incremento de la diferencia de potencial hasta alcanzar un máximo que posteriormente disminuye paulatinamente a lo largo del tiempo; y los pulsos de onda cuadrada, en los cuales tras el rápido incremento del voltaje, la diferencia de potencial se mantiene constante durante un periodo de tiempo y desciende rápidamente.

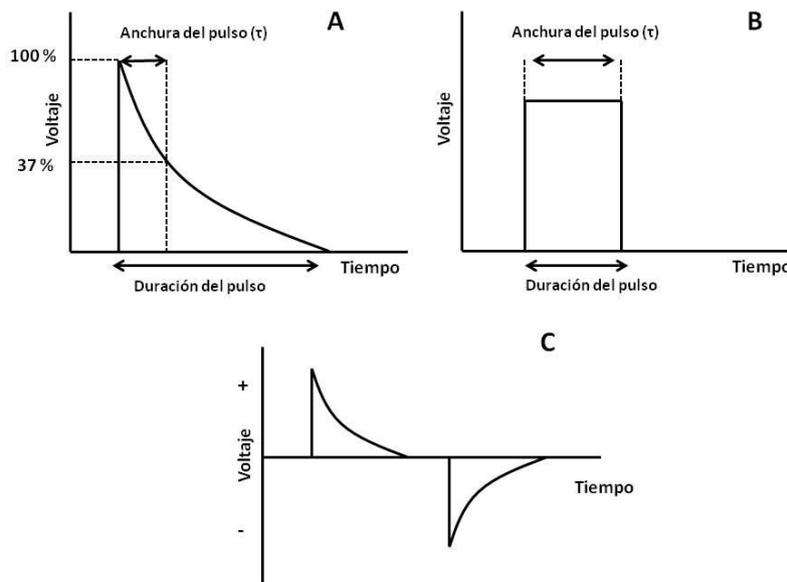


Figura 1.21. Tipos de pulsos aplicados en los tratamientos por PEAV. A: Caída exponencial. B: Onda cuadrada. C: Bipolar de caída exponencial.

Desde un punto de vista práctico, los pulsos de onda cuadrada son más adecuados que los pulsos de caída exponencial, dado que, en estos últimos, parte de la energía utilizada se aplica a un voltaje que no tiene efecto letal y calienta el alimento.

Tanto los pulsos de caída exponencial como los de onda cuadrada pueden ser monopares o bipolares. Los pulsos bipolares se caracterizan porque tras la aplicación de un pulso de una polaridad, se aplica otro de polaridad contraria (Figura 1.21C).

- Anchura del pulso (τ). Para los pulsos de caída exponencial, dado que la diferencia de potencial aplicada cambia constantemente con el tiempo, la anchura del pulso se define como el tiempo durante el cual el voltaje es superior al 37 % del valor máximo alcanzado en la descarga (Zhang y col., 1995). El cálculo de la anchura del pulso de onda cuadrada resulta más sencillo y exacto puesto que, a efectos prácticos, la duración del pulso se corresponde con su anchura (τ).

- Tiempo de tratamiento. El tiempo de tratamiento se define como el tiempo total efectivo durante el cual se aplica el campo eléctrico, y viene determinado por el número de

pulsos (n) multiplicado por la anchura del pulso aplicado. Generalmente, tanto el tiempo de tratamiento como la anchura del pulso se expresan en microsegundos (μs).

Otros parámetros de tratamiento son la frecuencia de aplicación de los pulsos, la energía asociada al pulso o la resistencia eléctrica de la cámara de tratamiento (Wouters y col., 2001).

1.3.3.2 Eficacia letal sobre diferentes microorganismos

Existen numerosos estudios acerca de la resistencia de diferentes especies microbianas frente a esta tecnología. De manera general se asume que las levaduras son los microorganismos más sensibles, que las bacterias Gram-positivas son más resistentes que las Gram-negativas, hecho atribuido al mayor grosor y rigidez de la envolturas celulares (Sale y Hamilton, 1967a; Hülshager y col., 1983; Zhang y col., 1994a; Qin y col., 1995; Qin y col., 1998; Saldaña y col., 2009; Monfort y col., 2010; Zhao y col., 2013), y que los esporos bacterianos no se ven afectados, incluso tras la germinación, por esta tecnología (Grahl y Märkl, 1996; Pagán y col., 1998; Raso y col., 1998a; Katsuki y col., 2000; Van Heesch y col., 2000). Finalmente, existen algunos estudios que indican que es posible inactivar los conidiosporos de algunos mohos y los ascospores de algunas levaduras.

Es importante remarcar que estas generalizaciones han de tomarse con precaución, ya que siempre hay excepciones. Por ejemplo, la afirmación de que las células Gram-positivas son más resistentes que las Gram-negativas sólo puede hacerse cuando el medio de tratamiento tiene un pH próximo a la neutralidad, pues a pH ácido (pH 4,0) las células Gram-negativas presentan una resistencia igual o incluso superior a la de las Gram-positivas (García y col., 2005b). Y además existen excepciones dentro de estas afirmaciones.

Por otra parte, se ha observado variabilidad en la resistencia a los PEAV entre las diferentes cepas de una misma especie microbiana, aunque los estudios al respecto son escasos (Lado y Yousef, 2003; Saldaña y col., 2009).

Como ya se ha señalado anteriormente, la comparación entre los diferentes estudios realizados hasta la fecha resulta difícil debido a los múltiples parámetros involucrados y a la heterogeneidad de los equipos y condiciones de tratamiento aplicadas (Álvarez y col., 2006a). A modo de ejemplo, la tabla 1.4 muestra la resistencia de diferentes especies y tipos de microorganismos (García y col., 2005a; García y col., 2005b; Korolczuk y col., 2006; Rodríguez-Calleja y col., 2006; San Martín y col., 2007).

Tabla 1.4. Resistencia de diferentes especies microbianas a los PEAV.

	Condiciones de tratamiento					Ciclos de inactivación
	Conductividad (mS/cm)	pH	Intensidad (kV/cm)	Anchura del pulso (μs)	Duración del pulso (μs)	
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 9610	2	3,0 – 7,0	12 - 25	2	20 - 400	4,0 - 6,0
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	2	3,0 – 7,0	12 - 25	2	20 - 400	1,5 - 6,0
<i>Listeria innocua</i> ATCC 51742	4,53	7,0	35 - 45	2	oct-70	1,0 - 6,0
<i>Escherichia coli</i> NCTC 9534	2	3,0 – 7,0	12 - 25	2	20-400	2,5 - 6,2
<i>Salmonella enteritidis</i>	8		30 - 70	0,05 - 3		1,0 - 5,0
<i>Salmonella senftenberg</i> ATCC 43485	2	3,0 – 7,0	12 - 25	2	20 - 400	1,0 - 4,5
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	2	3,0 – 7,0	12 - 25	2	20 - 400	1,0 - 3,0
<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10073	2	3,0 – 7,0	12 - 25	2	20 - 400	1,0 - 3,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	4,0 – 7,0	15 - 28	2	50 - 400	1,5 - 4,0
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917	2	4,0 – 7,0	25	Caida exponencial	50 - 300	1,2 - 1,5

1.3.3.3 Mecanismos de inactivación por pulsos eléctricos de alto voltaje. Dianas celulares

Existen diferentes teorías acerca de cuál es el mecanismo por el que se produce la muerte celular de los microorganismos sometidos a un tratamiento de pulsos eléctricos de alto voltaje. Todas ellas coinciden en al menos dos aspectos: que la principal estructura implicada en la inactivación por este agente es la membrana citoplasmática (Sale y Hamilton, 1967a,1967b; Tsong, 1991; Barbosa-Cánovas y col., 1999; Álvarez, 2002; Pagán y Mañas, 2006; Cebrián, 2009; Somolinos, 2010; Saldaña, 2011) y que la formación de poros (electroporación) en la membrana es responsable de buena parte de los fenómenos que se producen tras someter a las células a tratamientos por PEAV (Tsong, 1991; Mañas y Pagán, 2005; Pagán y Mañas, 2006; Cebrián, 2009; Somolinos, 2010; Saldaña, 2011).

Según Saulis (2010), cuando se somete a una célula a la acción de un campo eléctrico externo, se produce una serie de modificaciones que se pueden dividir en cuatro etapas:

1. Aumento del potencial transmembrana. La membrana citoplasmática se comporta como un condensador. En condiciones de reposo se produce en la célula un acúmulo de componentes con cargas de distinto signo a ambos lados de la membrana, lo que provoca un potencial transmembrana que, ante la acción de un campo eléctrico externo, aumenta paulatinamente hasta un valor máximo. Diversos factores pueden influir en esta fase, por ejemplo: parámetros del procesado (forma, duración y frecuencia de los pulsos), del medio de

tratamiento (composición del medio, densidad de la suspensión celular, presión osmótica) y otras características de la célula (forma, presencia de canales en la membrana).

2. Comienzo de la formación de los poros. La permeabilización de la membrana se produce al superar un potencial transmembrana crítico. La proporción de poros formados en una célula depende principalmente del potencial transmembrana y, por tanto, de los factores que lo condicionan. Entre ellos, la intensidad del campo eléctrico parece ser uno de los de mayor influencia (Saulis, 2010). Otros factores que pueden influir son la temperatura y la fluidez de la membrana.

Con objeto de explicar los mecanismos de iniciación del proceso de electroporación se han propuesto “modelos electromecánicos” (Neumann y Rosenheck, 1972; Crowley, 1973; Zimmermann y col., 1974), y modelos basados en la formación de poros hidrofóbicos e hidrofílicos en la bicapa lipídica (Barnett y Weaver, 1991; Saulis y Venslauskas, 1993a,1993b; Joshi y col., 2002).

Los “modelos electromecánicos” consideran que cuando la célula se expone a un campo eléctrico externo se produce una reorganización de las cargas, lo que provoca un aumento del potencial transmembrana, originando una deformación viscoelástica de la membrana como consecuencia de las fuerzas de atracción entre las cargas de signos opuestos. Si el campo eléctrico aplicado supera un determinado valor crítico, la atracción entre las cargas de ambos lados de la membrana citoplasmática produce fuerzas de electrocompresión suficientemente fuertes como para producir la ruptura dieléctrica de la membrana y el consecuente aumento de permeabilidad (Figura 1.22)(Zimmermann y col., 1974).

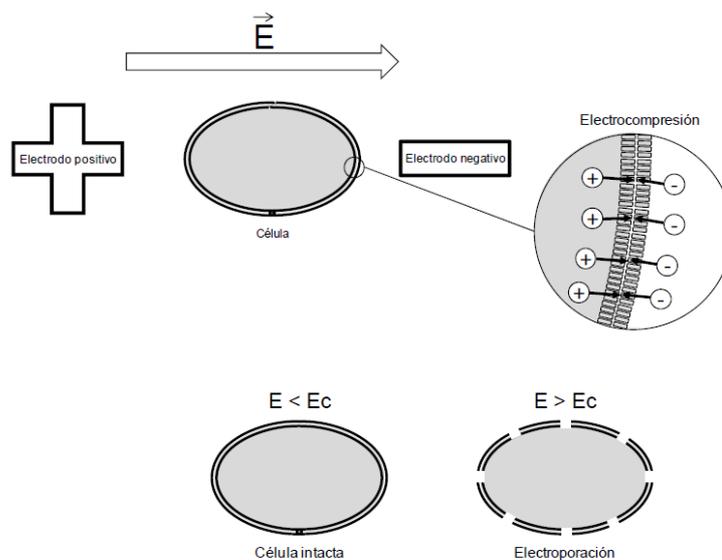


Figura 1.22. Esquema del mecanismo de permeabilización mediante PEAV según los “modelos electromecánicos”. E corresponde al campo eléctrico aplicado y E_c al campo eléctrico crítico (Saldaña, 2011).

INTRODUCCIÓN

Intentando completar las lagunas de los “modelos electromecánicos”, surgieron otras teorías que explican el incremento de permeabilidad por la formación de poros hidrofílicos. Según estas teorías, en la membrana lipídica se forman de manera normal y espontánea poros hidrofóbicos, debido a fluctuaciones térmicas de las moléculas lipídicas. Por encima de un tamaño crítico, los poros se transforman en hidrofílicos, reduciéndose la energía del sistema y aumentando, por tanto, su estabilidad (Figura 1.23). La duración de los poros formados es a su vez variable y se relaciona con su tamaño y la energía del sistema.

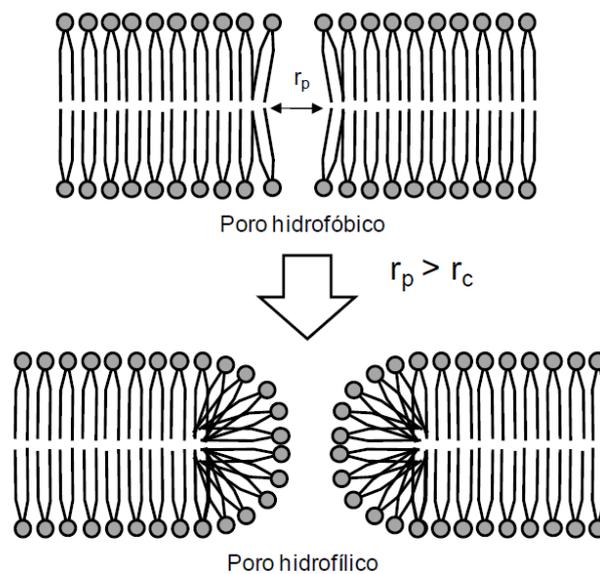


Figura 1.23. Esquema del mecanismo de permeabilización mediante PEAV según las teorías de la formación de poros hidrofílicos. r_p es el radio de poro, r_c es el radio crítico (Saldaña, 2011).

3. Evolución en el número o el tamaño de los poros formados. Para una adecuada eficiencia del procesamiento de los alimentos mediante PEAV, así como otras aplicaciones, el tamaño de los poros generados por la acción del campo eléctrico externo es un aspecto importante. Mientras dura la acción del campo eléctrico cambia el número y tamaño de los poros (Joshi y col., 2004; Krassowska y Filev, 2007). Estudios teóricos muestran que un pulso de una duración del orden de nanosegundos podría crear poros de menor tamaño pero en mayor cantidad, que un pulso de duración del orden de milisegundos (Gowrishankar y col., 2006). Datos experimentales (He y col., 2007) confirman la teoría de que al aumentar la amplitud y la duración de los pulsos, aumenta el número y el tamaño de los poros (Joshi y col., 2004; Krassowska y Filev, 2007). Otro de los factores que puede influir en la evolución de los

poros, así como en el número de poros formados como consecuencia del tratamiento de PEAV, es la temperatura del medio (Saulis, 2010).

4. Recuperación de la integridad de la membrana celular. El cierre de los poros sigue dos etapas, una rápida (de microsegundos a pocos minutos) en la que los poros reducen sensiblemente su tamaño, y una segunda etapa más lenta (de varios minutos a horas) en la que se completa el cerrado total de cada poro (Saulis y col., 1991). La capacidad de las células de sellar los poros abiertos es lo que les permite mantener la actividad metabólica y sobrevivir al tratamiento (Saulis y Venklauskas, 1993a). En caso contrario, tiene lugar una electroporación irreversible, lo que puede conllevar la pérdida de componentes intracelulares (ATP, ácidos nucleicos, proteínas, etc), así como la entrada de otras moléculas al interior.

Diversos autores han estudiado posibles indicadores de pérdida de funcionalidad de la membrana. Por ejemplo, el aumento en la actividad de enzimas intracelulares (β -galactosidasa, β -glucosidasa, α -amilasa, etc) en el medio extracelular (Sale y Hamilton, 1967b; Ohshima y col., 2002); la pérdida de capacidad de plasmolizar en un medio hipertónico (Sale y Hamilton, 1967b); y la incapacidad de los microorganismos para mantener constante el pH citoplasmático tras un tratamiento de pulsos eléctricos de alto voltaje.

El uso de colorantes fluorescentes, como el yoduro de propidio, ha permitido el estudio de la formación de poros en la membrana (Unal y col., 2001; Ulmer y col., 2002; Aronsson y col., 2005; García y col., 2007). Esta técnica ha permitido demostrar la permeabilización reversible o irreversible de la membrana citoplasmática, y la correlación de esta última con la inactivación celular, al menos durante los dos primeros ciclos de inactivación (Pagán y Mañas, 2006). También se ha intentado correlacionar la electroporación de la membrana con la muerte por PEAV mediante el uso del microscopio electrónico. Sin embargo, los resultados no son concluyentes, ya que, aunque se han observado diferentes alteraciones (alargamientos y presencia de cráteres, poros en las membranas o células con las envolturas completamente rotas), en la mayoría de las ocasiones no se obtiene una correlación clara entre el número de células alteradas y el número de células inactivadas determinado mediante recuento en placa (Rowan y col., 2000; Aronsson y col., 2001; Rowan y col., 2001; Cebrián y col., 2015).

A la vista de todo lo expuesto anteriormente puede concluirse que no se puede descartar que algún otro mecanismo, además de la permeabilización de la membrana, pudiera estar implicado en el proceso de inactivación microbiana mediante los PEAV. Estos mecanismos tan apenas han sido estudiados y se desconoce el efecto que pudieran causar los pulsos sobre otras estructuras celulares. A día de hoy se cree que los PEAV apenas provocan alteraciones en

INTRODUCCIÓN

proteínas, enzimas y otros componentes, por lo que, salvo en casos excepcionales, la inactivación enzimática o la desnaturalización proteica no participarían de forma importante en la inactivación microbiana por PEAV. El efecto sobre el ADN, ARN y los ribosomas actualmente se desconoce. Por otro lado, la aplicación de los PEAV puede generar sustancias con efectos bactericidas y la aparición de radicales que, a su vez, podrían generar especies reactivas del oxígeno (Sato y col., 1996; Kurahashi y col., 1997; Sun y col., 1997; Sun y col., 1998). Sin embargo, si los tratamientos aplicados se llevan a cabo con las oportunas precauciones no se deberían producir estas sustancias. Cabe destacar que Sale y Hamilton (1967b), Jacob y col. (1981) y Wouters y col. (1999) comprobaron que la inactivación de *E. coli*, *S. cerevisiae* y *L. innocua*, en una solución de NaCl o en un tampón fosfato con iones cloro no se debía a la aparición de componentes tóxicos generados por la electrolisis.

Recientemente, Arroyo y col. (2010) demostraron que la aparición de daño subletal en las células tratadas por PEAV no solo ocurría en la membrana citoplasmática sino también en la membrana externa de *Enterobacter sakazakii*. Esta fue la primera vez que se demostraron daños por PEAV en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Estos resultados abrieron la posibilidad de diseñar procesos combinados, mediante el uso de PEAV y compuestos antimicrobianos hidrofóbicos, frente a los cuales la membrana externa actúa como una barrera impermeable.

1.3.3.4 Cinética de inactivación por pulsos eléctricos de alto voltaje

Las curvas de supervivencia frente a los PEAV, al igual que ocurría con los tratamientos de APH, presentan en su mayoría forma cóncava, es decir, muestran un acusado fenómeno de cola (Gómez y col., 2005a; Gómez y col., 2005b; Cebrián y col., 2007; Puértolas y col., 2009; Raso, 2016). En este tipo de gráficas, se observa que la velocidad de inactivación es progresivamente más lenta al aumentar el tiempo de tratamiento. Al igual que en el caso del calor se han propuesto numerosas hipótesis para explicar estos fenómenos de cola, atribuyéndose a la diferente resistencia intrínseca de cada una de las células de una población, a la posible existencia de dos subpoblaciones o al desarrollo de resistencia durante el tratamiento, debido a una adaptación, a cambios estructurales y fisiológicos inducidos por el propio tratamiento, al efecto protector de los compuestos liberados por las células ya muertas o a la agregación de las células aún vivas durante el tratamiento (Álvarez y col., 2006b). Sin embargo, a día de hoy se desconoce cuál es el motivo de la aparición de colas.

De manera similar al calor o a las APH, se han propuesto numerosos modelos para describir la inactivación por PEAV, entre los que se encuentran los de Cole y col. (1993), Pruitt

y Kamau (1993), Augustin y col. (1998), Peleg y Cole (1998), Peleg y Penchina (2000), Mafart y col. (2002) o van Boekel (2002). De todos ellos, los más frecuentemente utilizados son los modelos basados en la distribución de Weibull, dada su versatilidad y facilidad de uso.

Algunos autores también intentaron crear un modelo secundario para estudiar como variaban los parámetros calculados con el modelo primario en función de diferentes factores medioambientales. Así, Peleg y Cole (1998) y Mattick y col. (2001), desarrollaron ecuaciones empíricas complejas para describir el efecto de la temperatura de tratamiento sobre los parámetros δ y ρ , derivados de la ecuación de Weibull.

Por su parte Álvarez (2002) propuso la utilización del valor Z_{PEAV} , que se define como el incremento en la intensidad de campo eléctrico, expresado en kV/cm, necesario para reducir un ciclo logarítmico el parámetro de escala δ (que corresponde al tiempo de tratamiento necesario para lograr la primera reducción decimal en el recuento microbiano).

1.3.3.5 Factores que influyen en la inactivación microbiana por pulsos eléctricos de alto voltaje

Factores que afectan antes del tratamiento

- Tipo, tamaño y forma del microorganismo. La resistencia relativa de los diferentes grupos microbianos se ha descrito previamente en la sección 1.3.3.2. Además, diversos autores han descrito una mayor resistencia en aquellas células de menor tamaño, ya que a menor tamaño celular menor es el potencial transmembrana (Zimmermann y col., 1974; Hülshager y col., 1983). Por otro lado, también la forma celular parece ejercer un cierto efecto (Pagán y col., 2005), ya que determina la intensidad de campo eléctrico necesaria para la disrupción de la membrana celular (Barbosa-Cánovas y Sepúlveda, 2005; Álvarez y col., 2006a). A partir de cálculos teóricos se ha establecido que las células bacilares son más sensibles que las esféricas (Toepfl y col., 2006).

- Fase de crecimiento y exposición previa al estrés. En general, los microorganismos que se encuentran en fase exponencial de crecimiento son más sensibles a los PEAV que los que están en fase estacionaria (Barbosa-Cánovas y col., 1998; Álvarez y col., 2000; Álvarez y col., 2002; Rodrigo y col., 2003; Somolinos y col., 2008; Schottroff y col., 2017). Este aumento en la sensibilidad puede ser debido a una mayor inestabilidad electromecánica de la membrana o al mayor tamaño de las células que se encuentran en la fase de división (Jacob y col., 1981).

Además, la expresión de determinados factores sigma de resistencia general también podría favorecer la mayor resistencia de las células en fase estacionaria. Así, Cebrián y col. (2007, 2009) y Somolinos y col. (2008) observaron una mayor inactivación por PEAV de las

INTRODUCCIÓN

cepas de *S. aureus* y de *E. coli* mutantes en el gen *sigB* y *rpoS*, respectivamente, respecto a la parental, lo que demostraba que la ausencia de los factores de resistencia general resultaba esencial en la resistencia a los PEAV. Posiblemente la importancia de estos factores sigma alternativos se deba a las proteínas que sintetizan y que son las encargadas de la reparación de la mayoría de los daños subletales de las membranas celulares. El efecto de otros choques, como el choque ácido, alcalino, oxidativo, o incluso con PEAV, sobre la resistencia de diferentes microorganismos a esta tecnología ha sido estudiado por diferentes autores. Evrendilek y Zhang (2003) demostraron que un tratamiento subletal previo con PEAV no aumentaba la resistencia de *E. coli* O157:H7 al posterior tratamiento por PEAV. Sin embargo, la resistencia de este microorganismo sí que aumentaba cuando se sometía previamente a un choque ácido. No obstante, Cebrián y col. (2009) no observaron este efecto al someter a *S. aureus* a un choque ácido ni oxidativo, aunque sí que observaron una mayor resistencia de este microorganismo a los PEAV cuando previamente había sido sometido a un choque alcalino. Además, a diferencia de los resultados observados por Somolinos y col. (2008), tanto Evrendilek y Zhang (2003) como Cebrián (2009) demostraron un aumento en la resistencia de *E. coli* y *S. aureus* a los PEAV tras someterse a un choque térmico. Todos estos resultados parecen indicar la necesidad de más estudios para aclarar la posible influencia de los choques en la supervivencia microbiana a posteriores tratamientos por PEAV.

- Temperatura de crecimiento. Las investigaciones realizadas muestran que los microorganismos cultivados a temperaturas menores a las óptimas para su crecimiento son más sensibles que aquellos crecidos a su temperatura óptima de cultivo (Álvarez y col., 2002; Ohshima y col., 2002; Cebrián y col., 2008). La causa de estas variaciones en la sensibilidad pueden deberse a la diferente composición lipídica de la envolturas celulares. A menor temperatura de cultivo, las membranas presentan una mayor concentración en ácidos grasos insaturados, lo que hace que aumente su fluidez. El aumento de la fluidez de la membrana podría ser la causa del aumento en la sensibilidad a los PEAV, si bien existen datos contradictorios al respecto (Cebrián y col., 2008; Wang y col., 2016b).

Factores que afectan durante el tratamiento

- Conductividad eléctrica del medio de tratamiento. Aunque el estudio de este parámetro de forma individual no resulta sencillo, puesto que la conductividad eléctrica afecta a distintos parámetros del proceso, generalmente se ha descrito que cuanto menor es la conductividad eléctrica del medio de tratamiento mayor es la inactivación microbiana (Jayaram y col., 1993; Vega-Mercado y col., 1996; Dutreux y col., 2000).

- pH del medio de tratamiento. La influencia del pH del medio sobre la resistencia microbiana a los PEAV ha sido intensamente estudiada por diversos autores. El efecto del pH en la resistencia de los microorganismos frente a los tratamientos por PEAV parece depender del microorganismo a tratar (Pagán y col., 2005). De manera general, la mayor resistencia de las bacterias Gram-positivas en medio de pH neutro parece estar relacionada con la aparición de daños en la membrana y su posterior reparación; por otro lado, en pH ácido las células se harían más sensibles a los PEAV apareciendo daños irreversibles en la membrana (García y col., 2005a). En cuanto a las Gram-negativas, se ha observado la existencia de una población de bacterias dañadas subletalmente tras los tratamientos de PEAV en medio ácido (Somolinos y col., 2008). No obstante existen muchas excepciones a estas observaciones generales.

- a_w del medio de tratamiento. Los estudios realizados hasta la fecha indican que, al igual que frente a otros agentes, el descenso de la a_w del medio de tratamiento protege a los microorganismos frente a los PEAV (Álvarez y col., 2000; Min y Zhang, 2000; Álvarez y col., 2002; Álvarez y col., 2003a; Somolinos y col., 2008). Esto puede ser debido a que, cuando las células se encuentran en un medio de baja a_w , se produce una salida de agua del interior de los microorganismos al exterior y, por tanto, una reducción de su volumen. Como ya se ha expuesto anteriormente, las células con un menor tamaño son más resistentes a la electroporación. Además, este fenómeno produce probablemente un estrechamiento de la membrana citoplasmática, seguido de una disminución de la permeabilidad y de la fluidez (Neidhardt y col., 1990). Por otra parte, el tipo de soluto que provoca el descenso de la actividad de agua del medio influye en la magnitud del efecto observado. Así, la adición de sacarosa produce un mayor incremento en la resistencia microbiana frente a los PEAV que la adición de glicerol (Álvarez y col., 2006a).

- Composición del medio de tratamiento. Aunque se han realizado diversas investigaciones sobre la influencia de la composición del medio de tratamiento en la resistencia microbiana a los pulsos eléctricos, las diferentes condiciones de tratamiento y composición de los medios de tratamiento utilizados no permiten obtener conclusiones definitivas. Diversos autores han observado una mayor resistencia microbiana a los PEAV cuando el medio de tratamiento posee cationes divalentes como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} , grasa o proteínas (Grahl y Märkl, 1996; Jaeger y col., 2009). Por otro lado, la presencia de determinados componentes en el medio de tratamiento aumenta en cierta medida la eficacia letal de la tecnología de los PEAV. Por ejemplo, algunos ácidos orgánicos (ácido benzoico o sórbico), bacteriocinas (como la nisina) o aceites esenciales (como el carvacrol) (Liang y col.,

INTRODUCCIÓN

2006; Sobrino-López y Martín-Belloso, 2006; Mosqueda-Melgar y col., 2007; Martín-Belloso y Sobrino-López, 2011; Saldaña y col., 2012; Espina y col., 2014).

- Temperatura de tratamiento. Un incremento en la temperatura de tratamiento conduce a un aumento su letalidad (Zhang y col., 1994b; Aronsson y Rönner, 2001; Heinz y col., 2001; Ohshima y col., 2002; Saldaña y col., 2012). Existen diferentes teorías para explicar este efecto; entre ellas la disminución del potencial transmembrana necesario para producir la electroporación (Coster y Zimmermann, 1975) o el cambio en el estado físico de la membrana, que presentaría un mayor grado de fluidez (Stanley y Parkin, 1991).

Factores que afectan después del tratamiento

La presencia de daño subletal tras la exposición de los microorganismos a los PEAV ha sido estudiada por diferentes métodos.

La siembra en medio selectivo con NaCl es uno de los métodos más ampliamente utilizados para la detección del daño subletal en la membrana citoplasmática de los diferentes microorganismos (García y col., 2003; García y col., 2005a; Monfort y col., 2010; Saldaña y col., 2010b; Zhao y col., 2013; Zhao y col., 2014; Cebrián y col., 2015; Schottroff y col., 2017). Las investigaciones realizadas con esta metodología han permitido demostrar una disminución en el recuento en placa en los medios selectivos en comparación con los no selectivos, lo que indica un daño en la membrana citoplasmática por PEAV.

Otro método para estudiar el daño subletal en las células tratadas por PEAV ha sido el análisis y cuantificación del contenido de iones (Na^+ , Cl^- , K^+ , etc.) que, debido a la permeabilización de la membrana, salen al exterior celular (Saulis y col., 2007; Cebrián y col., 2015). Sin embargo, es difícil determinar el daño subletal con esta técnica, ya que los compuestos intracelulares podrían salir al exterior durante la electroporación reversible (Schottroff y col., 2017).

La tinción con colorantes fluorescentes específicos también ha sido usada para la determinación de la permeabilización de la membrana. Diversos autores han utilizado la tinción con yoduro de propidio para determinar el daño en la membrana por PEAV (Chang y col., 2012; Zhao y col., 2014). Otro colorante usado para la detección del daño subletal ha sido la carboxifluoresceína diacetato (cFDA), que atraviesa la membrana y dentro de la célula es hidrolizada por esterasas emitiendo fluorescencia. Según Jaeger y col. (2009), las células subletalmente dañadas tras el tratamiento PEAV presentaban daños en la membrana detectables mediante tinción con IP, y también presentaban tinción con cFDA, lo que indicaba que la actividad enzimática no se veía afectada por estos tratamientos. Por el contrario, Zhao y

col. (2014) observaron una agregación proteica en el citoplasma de *Saccharomyces cerevisiae* y una disminución en la actividad de muchas enzimas, entre ellas diversas esterasas, tras el tratamiento por PEAV. Sin embargo, aunque todos estos resultados indican que se generan daños subletales en la membrana de las células tratadas por PEAV, como ya se ha indicado anteriormente en ocasiones esta permeabilización es reversible.

Chueca y col. (2015) observaron que, debido a los tratamientos por PEAV, se producía una sobreexpresión de 20 genes en *E. coli* MG1655. Estos genes se pueden distribuir en siete grupos funcionales diferentes: respiración aerobia, respiración celular, obtención de energía derivada de la oxidación de compuestos orgánicos, generación de metabolitos precursores, procesos de oxidación reducción, procesos metabólicos de la célula y participación en el ciclo TCA, siendo este último de gran importancia, ya que el ciclo TCA es una vía catabólica de la respiración aerobia y el primer paso en la generación de precursores de la biosíntesis, ya que genera energía y poder reductor (en forma de NADH, NADPH o FADH₂) que se utiliza para construir componentes bacterianos o para generar nuevas moléculas de ATP en el sistema de transporte de electrones.

Por último, Tanino y col. (2012) encontraron que los PEAV inducían una respuesta al estrés oxidativo en *Saccharomyces cerevisiae*, ya que diferentes genes que codifican las enzimas de la síntesis de glutatión (GSH1, GLR1) y superóxido dismutasas (SOD1 y SOD2) se expresaban más tras los tratamientos.

1.3.4 Acidez

1.3.4.1 **Introducción.**

La adición de ácidos como conservantes químicos es una técnica ampliamente utilizada en la industria alimentaria, y aunque algunos ácidos fuertes, como el clorhídrico (E-507), se utilizan en la formulación de varios alimentos, principalmente en quesos no madurados (FAO, 2001), los ácidos más comúnmente utilizados son los ácidos orgánicos, generalmente conocidos como ácidos débiles o ácidos carboxílicos (Cherrington y col., 1991), entre los que se incluyen los ácidos acético, ascórbico, cítrico, láctico y málico.

El ácido acético se utiliza como conservante y se caracteriza por presentar una mayor eficacia antimicrobiana frente a bacterias que frente a mohos y levaduras (Ingram y col., 1956), siendo especialmente efectivo sobre *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Bacillus* spp. y *Clostridium* spp. Su utilización presenta como principales ventajas su bajo coste y toxicidad, mientras que entre sus mayores inconvenientes destaca el intenso sabor que transmite a los alimentos (Hartwig y McDaniel, 1995). El ácido ascórbico se encuentra presente de forma natural en la mayoría de frutas y vegetales, siendo conocido comúnmente como vitamina C. Comercialmente se obtiene por fermentación bacteriana de la glucosa, seguida de una oxidación química, e industrialmente se emplea como antioxidante, principalmente en carne y productos cárnicos, en los que retrasa o previene la oxidación de la mioglobina. El ácido cítrico es un constituyente natural de multitud de frutas. Comercialmente se obtiene mediante procesos fermentativos con levaduras y juega un importante papel en las industrias, utilizándose como regulador de la acidez, como compuesto aromático, para incrementar la capacidad gelificante y para prevenir el pardeamiento enzimático. Además, por su actividad antimicrobiana frente a mohos y bacterias, también podría utilizarse como aditivo conservante, encontrándose muy extendido su uso por su agradable sabor, en contraste con el resto de ácidos orgánicos. El ácido láctico se produce de forma natural durante la fermentación de algunos alimentos por medio de las bacterias ácido-lácticas. Aunque puede obtenerse por síntesis química, aproximadamente el 90 % del ácido láctico se obtiene por procesos de fermentación. Tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana, siendo efectivo frente a *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Bacillus* spp. y *Clostridium* spp. En la industria alimentaria se utiliza con diversos fines, tales como acidificar o regular el pH de los alimentos, reducir su actividad del agua y potenciar el efecto de algunos antioxidantes como el ácido ascórbico (Smulders y Greer, 1998; Fernández, 2007).

El ácido málico se usa habitualmente en la industria alimentaria como acidulante en gaseosas, refrescos y productos a base de fruta. En la elaboración del vino, durante la fermentación maloláctica, se transforma en ácido láctico, proporcionando una acidez más suave.

1.3.4.2 Eficacia letal sobre diferentes microorganismos

La acidificación de los alimentos es capaz de prevenir el crecimiento de muchos de los microorganismos patógenos y alterantes que los contaminan, sin embargo existen excepciones. Así, aunque los mohos y las levaduras son capaces de crecer en productos muy ácidos (pH 2,0 e inferiores) y las bacterias ácido lácticas a pH cercanos a 3,5; de forma general sigue considerándose que por debajo de pH 4,2 la mayoría de los microorganismos crecen con dificultad y/o resultan inactivados. Aunque el efecto bacteriostático de la acidificación puede considerarse universal, el efecto bactericida es mucho más restringido, existiendo muchos grupos microbianos, como las enterobacterias, que soportan un almacenamiento prolongado en medios acidificados. Por otra parte, se ha demostrado que la preexposición de las células a un pH ácido subletal puede inducir una respuesta adaptativa que provoca un aumento de la resistencia a la acidez, siendo ésta una cuestión especialmente importante desde el punto de vista de la seguridad alimentaria.

La respuesta homeostática mantiene la viabilidad celular ante pHs externos alejados del intracelular, modulando la actividad de la bomba de protones. Cuando se encuentra en un medio ácido, la célula tiene que impedir que los H⁺ accedan a su interior o expulsarlos a la misma velocidad con que penetran; esto se logra mediante la bomba de protones, presente en la membrana y que consume energía. Si su consumo es excesivo, la célula puede quedar completamente exhausta y perder su viabilidad (Davidson y Harrison, 2002). Si la célula no logra mantener el pH intracitoplasmático estable no podrá sintetizar componentes celulares y se producirá una reducción en la actividad de los sistemas de transporte, limitándose la entrada de iones esenciales y nutrientes, por lo que será incapaz de dividirse y crecer o, al menos, se reducirá la tasa de crecimiento y aumentará la fase de latencia (Cheroutre-Vialette y col., 1998).

Por todo ello, dada la importancia del pH intracelular en el crecimiento microbiano, no es sorprendente que haya diversos componentes celulares involucrados en su mantenimiento:

- Los **tampones citoplasmáticos**: Las cadenas laterales de los aminoácidos que componen las diferentes proteínas del citoplasma presentan cierta capacidad

tamponante que les permite neutralizar protones, aunque en cantidad limitada. Esta capacidad tamponante es muy similar en todos los microorganismos independientemente de su metabolismo y del medio de crecimiento (Booth, 1985).

- La **producción de bases**: Este es uno de los mecanismos menos estudiados en cuanto a su efecto en el mantenimiento de la homeostasis en las bacterias (Booth, 1985). La ruta metabólica de la ureasa se ha descrito en algunas bacterias, como *Streptococcus salivarius* o *Actinomyces naeslundii* (Sissons y col., 1990), y la ruta de la arginina deaminada (ADI) en bacterias ácido lácticas, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Cotter y Hill, 2003). Este último sistema es inducido por la presencia de arginina generando ornitina y ATP. Sin embargo, su inducción por el pH no está del todo clara (Redon y col., 2005).
- El **transporte activo de H⁺**: Los microorganismos Gram-negativos mantienen su pH interno mediante la utilización de bombas de protones que expulsan los iones H⁺ al exterior de la célula. Booth (1985) describió las bombas de antiporte K⁺/H⁺ en *E. coli* como principal sistema de transporte de iones H⁺, sin embargo esta repuesta es de tipo constitutivo y hace que la viabilidad de estas células dependa en gran medida de la concentración de K⁺ extracelular.

En el caso de los microorganismos fermentativos, el sistema principalmente utilizado es la F₀F₁ ATPasa (Quivey y col., 2000; Cotter y Hill, 2003). Este sistema regula el pH intracelular, se encarga de la generación de la fuerza motriz de los protones y de la expulsión de los iones H⁺ mediante la escisión de una molécula de ATP (Kobayashi, 1985). Este sistema también ha sido descrito en diversas bacterias Gram-positivas, como *Listeria monocytogenes* (Cotter y Hill, 2003) ,y Gram-negativas, como *E. coli* o *Salmonella* (Hall y col., 1995; Richard y Foster, 2004).

- Las **aminoácido-decarboxilasas**: Las reacciones catalizadas por las aminoácido-decarboxilasas en presencia de un transportador de membrana son de gran importancia en el mantenimiento de la homeostasis y en la resistencia microbiana frente al medio ácido (Álvarez-Ordóñez y col., 2010). Un ejemplo muy conocido es la glutamato-decarboxilasa (GAD). Se trata de una bomba de protones que, a través de la reacción de decarboxilación del ácido glutámico, consume iones hidrógeno. Este mecanismo junto con el de la ornitina decarboxilasa contribuyen muy significativamente a la supervivencia de *E. coli* frente a pHs ácidos (Foster, 2004).
- **Sistemas pasivos que participan en la prevención de la alteración del pH intracelular**: La composición en ácidos grasos de membrana varía cuando las células crecen a pH ácido o han sido sometidas a un choque ácido subletal (Álvarez-Ordóñez

y col., 2008). En células Gram-negativas se ha descrito un aumento en la proporción de ácidos grasos saturados y con anillo de ciclopropano (CFA), mientras que la concentración de ácidos grasos monoinsaturados disminuye (Brown y col., 1997; Grogan y Cronan, 1997). Kim y col. (2005) observaron que la eliminación del gen *cfa*, que codifica la enzima responsable de la síntesis de ácidos grasos CFA, provoca un descenso en la resistencia de las células al pH ácido. Posiblemente esta mayor resistencia sea debida a que este fenómeno provoca una menor permeabilidad a los protones por parte de la membrana, ayudando así a la supervivencia microbiana (Shabala y Ross, 2008); a que los fosfolípidos con CFA interactúan con los transportadores de membrana resultando en una mayor actividad de estos últimos (Foster, 2000); o a que se produce un aumento en el grosor de la membrana, ya que la permeabilidad de los protones es inversamente proporcional al grosor de la membrana celular (Paula y col., 1996). Por otro lado, también se ha observado que la composición de ácidos grasos de la membrana determina la resistencia a la acidez de las células Gram-positivas (Cotter y Hill, 2003; Fozo y Quivey, 2004). Así, en el caso de *Streptococcus mutans*, se describió un descenso en la concentración de ácidos grasos saturados de cadena corta y un incremento en los ácidos grasos monoinsaturados de cadena larga al someter al cultivo a un pH ácido.

1.3.4.3 Mecanismos de inactivación por acidez. Dianas celulares.

Aunque actualmente no se conoce a ciencia cierta el mecanismo de inactivación microbiana por efecto de los acidificantes, la mayoría de los autores opinan que la bajada del pH del medio desnaturaliza enzimas de las envolturas celulares y acidifica el citoplasma bacteriano, afectando así al metabolismo y multiplicación celular (Foster, 2000; Roe y col., 2002; Booth y Stratford, 2003; Fernández, 2007). Sin embargo, se han observado grandes diferencias en el modo de acción y en los mecanismos de defensa desarrollados por los microorganismos cuando son tratados con ácidos débiles o con ácidos fuertes. Los ácidos débiles sin disociar pueden atravesar la membrana celular y disociarse en el interior produciendo una acidificación del citoplasma e interfiriendo el metabolismo microbiano. Por otro lado, los ácidos fuertes, totalmente disociados en el medio, ejercen principalmente su efecto en la superficie celular desnaturalizando enzimas y proteínas de las envolturas celulares (Foster, 2000). No obstante, aunque diversos autores han confirmado que la mayor parte del efecto antimicrobiano de los ácidos débiles se debe a su forma no disociada (Presser y col., 1997; Brul y Coote, 1999; Foster, 1999), también su forma disociada contribuye a este efecto,

INTRODUCCIÓN

actuando de un modo similar a los ácidos fuertes (Eklund, 1985; Booth y Kroll, 1989; Axe y Bailey, 1995; Stratford y Eklund, 2003).

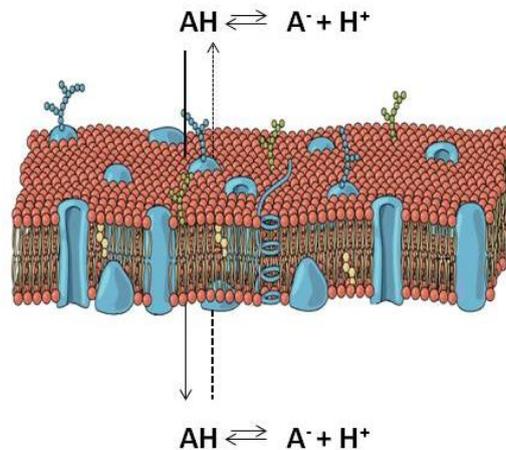


Figura 1.24. Mecanismo de entrada y acción de un ácido débil.

Diversas estructuras y funciones se ven alteradas por la exposición al pH ácido, entre ellas las envolturas celulares. La membrana externa es una de las estructuras más afectadas tras la exposición de los microorganismos al pH ácido (Alakomi y col., 2000). Así, Roth y Keenan (1971) observaron que el número de células de *E. coli* recuperadas en un agar selectivo con sales biliares era muy inferior al de las recuperadas en un agar no selectivo, tras la exposición a diferentes pHs ácidos (3,0-4,3). El mecanismo del efecto de la acidificación en la alteración de las envolturas celulares parece deberse, en parte, a la acción del pH ácido sobre sus proteínas, ya que la configuración y actividad de estas moléculas viene determinada por la protonación de los aminoácidos, que lógicamente cambiará con el pH del medio. Por otra parte, la acidificación determina el gradiente de protones existente entre el espacio extra e intracelular, lo que puede afectar a la funcionalidad de los canales iónicos. Cualquiera de estas modificaciones puede conllevar una alteración de los fenómenos de transporte a través de la membrana pudiendo afectar, por ejemplo, a la entrada y salida de nutrientes, lo que comprometerá el crecimiento y supervivencia de la célula (Madshus, 1988; Booth y Kroll, 1989). La acidificación también parece afectar a algunos enzimas ubicados en las envolturas celulares (Booth y Kroll, 1989).

La mayoría de los autores opinan que la disminución del pH interno (pHi) es la principal causa de la inactivación microbiana por la acidificación, sobre todo en el caso de los ácidos débiles. La bajada del pHi produce un enlentecimiento de muchas de las reacciones químicas necesarias para la vida de la célula, lo que puede inducir cambios estructurales y metabólicos,

una reducción de la velocidad de crecimiento y un aumento de la fase de latencia (Cheroutre-Vialette y col., 1998). Estos cambios, dependiendo de su intensidad, pueden también producir una desnaturalización proteica y una pérdida de actividad por parte de las enzimas citoplasmáticas conduciendo a la muerte celular (Sofos y Busta, 1981; Roe y col., 2002; Booth y Stratford, 2003). Neal y col. (1965) y Blankenship (1981) demostraron que, tanto en el caso de las levaduras como en el de las células bacterianas, la acidificación con ácido acético producía una importante desnaturalización proteica.

Como ya se ha nombrado anteriormente, la forma no disociada de los ácidos orgánicos puede atravesar fácilmente la membrana de la célula bacteriana y una vez dentro del citoplasma se disocia en aniones y protones (Cherrington y col., 1990; Cherrington y col., 1991; Davidson y col., 2001). El aumento de la concentración interna de aniones provoca una alteración de la osmolaridad desencadenando un mecanismo de compensación celular que consiste en un aumento de los niveles de Na^+ , K^+ y/o glutamato, que conlleva un incremento de la fuerza iónica intracelular y de la turgencia. Este proceso provoca un aumento de la presión mecánica sobre la pared del microorganismo, que, de no ser compensada, puede hacer que la célula se rompa (Foster, 1999). Además, una alta concentración de aniones citoplasmáticos puede interferir en las reacciones enzimáticas celulares (Roe y col., 2002). Por otro lado, la acumulación de protones afecta directamente al pH_i de los microorganismos (Carmelo y col., 1997; Arneborg y col., 2000). El mantenimiento del pH_i cercano a la neutralidad para conservar la funcionalidad de las macromoléculas supone la excreción por parte de la célula del exceso de hidrogeniones, hecho que, por un lado, provoca la disipación de la fuerza motriz de los protones (Gould y col., 1983), y, por otro, un gasto de ATP que puede causar el agotamiento de la energía celular (Davidson y col., 2001; Cotter y Hill, 2003). Además, la acidificación también produce un efecto sobre las enzimas glicolíticas ácido-sensibles (Cotter y Hill, 2003) y sobre las diferentes enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Booth y Kroll, 1989), lo que afecta a la generación de ATP, y produce desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa (Stratford y Eklund, 2003).

El ADN y el ARN también pueden verse afectados por la acidificación (Mackey, 2000). La acidificación del citoplasma produce una mayor depurinación y depirimidinación que la alcalinización (Lindahl y Nyberg, 1972), generando los denominados sitios AP (apurínico-apirimidínico), cuya reparación se lleva a cabo por varias AP-endonucleasas que se activan tras la adaptación a la acidez. Esta adaptación indica por lo tanto que, efectivamente, la acidificación causa daños al ADN. Además, la exposición a medios ácidos de cepas mutantes en genes que codifican proteínas relacionadas con la reparación del ADN provoca un descenso en

INTRODUCCIÓN

su resistencia a la acidez, indicando que el material genético resulta dañado por la exposición a medios ácidos. Algunos de los genes eliminados para realizar estas investigaciones fueron: el gen *polA1*, que codifica la ADN polimerasa I encargada de la reparación de roturas en una sola cadena del ADN (Sinha, 1986); el gen *recA*, que codifica la proteína RecA, responsable de la reparación de horquillas de replicación (Quivey y col., 2000); y el gen *uvrA*, que codifica una excinucleasa que actúa eliminando las secciones dañadas cuando éstas son de gran tamaño (Kim y col., 2006).

Por último, la quelación de cationes por el ácido cítrico (Roth y Keenan, 1971), la inhibición de las enzimas con grupos sulfhidrilo (Davidson y col., 2001) o la inhibición de la germinación de los esporos (Seward y col., 1982) por el ácido ascórbico, entre otros ejemplos, indican que los ácidos débiles poseen actividades antimicrobianas específicas e independientes del grado de acidificación (Fernández, 2007).

Así, de todo lo mostrado anteriormente se puede concluir que el pH ácido, al igual que en el caso del calor y de las APH, es un agente que actúa sobre múltiples dianas celulares.

1.3.4.4 Cinética de inactivación por acidez

Los perfiles observados en las gráficas de supervivencia de las células suspendidas en medios ácidos han sido muy variables según lo descrito por los diferentes autores. De esta manera, se han obtenido gráficas tanto con un perfil recto (O'Sullivan y Condon, 1999; Diez-Gonzalez y Russell, 1999; Li y col., 2001; Koutsoumanis y Sofos, 2004), como cóncavo (Leyer y col., 1995; Davis y col., 1996; Leyer y Johnson, 1997; Diez-Gonzalez y Russell, 1999; Phan-Thanh y col., 2000) e incluso sigmoideo (Leyer y Johnson, 1992; Leyer y col., 1995; Conner y Kotrola, 1995). Cabe destacar que estas desviaciones de la linealidad se han atribuido a causas similares a las descritas para el calor. Así, la aparición de hombros se podría deber a fenómenos de daño y reparación celular o a que la acidificación actúa sobre más de una estructura diana. También podrían ser debidos a la necesidad de que transcurra cierto tiempo para que se produzca la acidificación del citoplasma hasta un valor de pH suficientemente bajo para causar la inactivación celular. Por otro lado, las colas observadas en los perfiles sigmoideos podrían deberse, como en el caso de los tratamientos térmicos, a fenómenos adaptativos de desarrollo de resistencia durante el tratamiento o a la existencia de subpoblaciones de diferente resistencia a la acidez.

1.3.4.5 Factores que influyen en la inactivación microbiana por acidez.

La inactivación microbiana por acidez está condicionada por una serie de factores que actúan previamente al tratamiento, durante el mismo o, incluso después. Entre ellos se encuentran:

- La fase de crecimiento. Las células en fase estacionaria suelen ser más resistentes que en fase exponencial (Cotter y Hill, 2003). En el caso de las bacterias Gram-negativas el incremento en resistencia tras la entrada en fase estacionaria se atribuye a la mayor actividad del factor σ^S , que controla parcialmente la expresión de los genes *gas*, encargados de los distintos componentes de las glutamato decarboxilasas, y el *cfa* (ciclopropano sintetasa) (Foster, 2000; Hengge-Aronis, 2000). Un papel similar al de σ^S es el que tiene el factor σ^B de los microorganismos Gram-positivos (Ferreira y col., 2003; Wemekamp-Kamphuis y col., 2004; Cebrián, 2009).

- La temperatura de crecimiento. En general son más resistentes las células crecidas a mayor temperatura (Cheng y Kaspar, 1998).

- La composición del medio de crecimiento. Los datos existentes en la bibliografía respecto a este tema son contradictorios. Algunos autores han observado una mayor resistencia en las células crecidas en medios complejos (Hickey y Hirshfield, 1990), mientras que otros autores observaron el efecto contrario, es decir una mayor resistencia de las células crecidas en medios pobres (Rowbury, 1995).

- El pH de crecimiento y el tipo de acidificante. (Fernández, 2007) observó una disminución en la velocidad de crecimiento de *E. faecium* en medios acidificados con diferentes ácidos, siendo más notable el efecto en presencia de ácido láctico y cítrico. Sin embargo, posteriormente observó, al igual que otros autores, una mayor resistencia de las células crecidas en medios ácidos, aunque la magnitud de este efecto protector variaba dependiendo del acidificante utilizado (Cheng y Kaspar, 1998; Fernández, 2007).

- Exposición a choques previos. Además de la importancia del pH del medio de crecimiento, diversos autores han descrito una mayor resistencia posterior al pH ácido cuando los microorganismos son sometidos a un choque ácido previo, es decir, se han sometido a un pH subletal durante un tiempo del orden de minutos u horas (Sagarzazu, 2010). En este caso se asume que la adquisición de resistencia frente a la acidez es consecuencia de la síntesis de una serie de proteínas denominadas genéricamente proteínas del choque ácido o ASP (Phan-Thanh y col., 2000; Welin y col., 2003). Dentro de este grupo se incluyen las distintas subunidades de la ATPasa de membrana, las aminoácido-decarboxilasas, diversas chaperonas y proteasas, y

INTRODUCCIÓN

enzimas de reparación del ADN (Tabla 1.5). Existen además otras muchas proteínas que resultan afectadas y cuya función es aún desconocida. También se ha propuesto que la exposición a la acidez podría causar cambios en la conformación de la superficie de las células, sin necesidad de síntesis proteica *de novo* (Sagarzazu, 2010).

Tabla 1.5. Grupos de proteínas inducidas por el choque ácido con funciones demostradas en la resistencia al estrés.

ASPs	Microorganismos
ATPasa de membrana	<i>L. monocytogenes, S. oralis, S. mutans, S. typhimurium</i>
Aminoácido decarboxilasas	<i>E. coli, S. typhimurium, L. monocytogenes, L. lactis</i>
Otras bombas de protones	<i>S. aureus</i>
Neutralizadores	<i>S. aureus, H. pylori</i>
Chaperones y proteasas	<i>L. monocytogenes, S. oralis, S. mutans, L. lactis, S. aureus</i>
Reparación del ADN	<i>S. mutans, S. aureus</i>
Transportadores	<i>S. oralis, S. mutans, S. aureus</i>
Resistencia al estrés oxidativo	<i>L. lactis, S. oralis, S. aureus, L. monocytogenes, S. typhimurium</i>

Además, al igual que ocurría en otros tratamientos como el calor, existen diversos mecanismos que regulan el desarrollo de la respuesta al choque ácido. Estos son complicados y variados, como en el caso de *E. coli* en el que se ha descrito hasta tres mecanismos distintos: ATR, respuesta a la tolerancia al medio ácido desarrollada en las células en fase exponencial cuando son expuestas a un pH subletal; ARS, respuesta al medio ácido de las células en fase estacionaria sometidas a un pH subletal; y AHR, respuesta de habituación al medio ácido desarrollada en las células al crecer en un medio con un pH subletal. Rowbury (1995) observó que el crecimiento a pH ácido de *Salmonella typhimurium* activaba la respuesta ácido-tolerante de este microorganismo a través de dos etapas: el choque ácido previo a un pH de 5,8, el cual permite al microorganismo mantener un pH interno neutro, y un choque ácido posterior a un pH de 4,5, que engloba la síntesis de nuevas proteínas necesarias para resistir unas condiciones de acidez extrema. Sin embargo esta respuesta por parte de *S. typhimurium* no se producía si esta cepa carecía de los genes *atp*, *fur* o *phoP*. Estos autores relacionan esta adaptación con un menor daño a las proteínas, al ADN, y un mantenimiento de la homeostasis celular. El mantenimiento de la homeostasis, es decir, el mantenimiento del pH interno de las células, resulta esencial para la supervivencia y crecimiento microbiano ya que determina el

rango de actividad de las enzimas y, por lo tanto, la funcionalidad de todas las vías metabólicas (Cotter y Hill, 2003). Sin embargo, los mecanismos encargados de mantener esta homeostasis dependen del tipo de microorganismo, según se trate de organismos acidófilos, alcalófilos o neutrófilos (Booth, 1985). Dentro de este último grupo se encuentran la mayoría de los microorganismos de interés en microbiología alimentaria y cuentan con una variedad de mecanismos de homeostasis, siendo, por ejemplo, diferentes los sistemas de transporte de membrana de protones en las especies Gram-positivas y en las Gram-negativas, y entre los microorganismos fermentativos y los oxidativos (Booth, 1985; Cotter y Hill, 2003). Asimismo, cabe destacar que el choque ácido no solo incrementa la resistencia a posteriores tratamientos con este agente, sino que también se generan resistencias cruzadas con otros agentes como calor, peróxido de hidrogeno, etanol o cloruro sódico (Lou y Yousef, 1997; Cheng y col., 2002; Greenacre y Brocklehurst, 2006; Cebrián, 2009; Sagarzazu, 2010).

- El medio de tratamiento. La presencia de fosfatos o polifosfatos en el medio de tratamiento protege a las células frente al tratamiento ácido (Rowbury, 1995).
- El tipo de acidificante del medio de tratamiento. Diez-Gonzalez y Russell (1999) estudiaron el efecto de diferentes ácidos orgánicos en la inactivación de *E. coli* O157:H7, y observaron que la adición de ácido láctico, ácido benzoico o ácido fórmico producía una mayor inactivación que la de ácido acético, ácido butírico o ácido propiónico.
- El tiempo y la temperatura de tratamiento. De manera general se puede asumir que a mayor tiempo de exposición de un microorganismo a pH ácido mayor será su inactivación. Además, la temperatura de tratamiento también influye en la mayor o menor inactivación microbiana. Así, en el caso de *Y. enterocolitica*, *E. coli* y *L. monocytogenes* una temperatura de 4°C aumentaba la resistencia de estos microorganismos frente a la acidez en comparación con un tratamiento a 20°C y a 40°C, siendo en este último caso cuando las células presentaban una mayor sensibilidad (Virto y col., 2005b; Virto y col., 2006).

1.4 CONOCIMIENTO ACTUAL ACERCA DE LA RELACIÓN ENTRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA INACTIVACION CELULAR POR CALOR, APH, PEAV Y ACIDEZ

A lo largo de los últimos años el estrés oxidativo se ha clasificado en dos (Mols y Abee, 2011):

1. Estrés oxidativo primario: este estrés es producido en las células expuestas a un agente oxidante como pueden ser el peróxido de hidrógeno, el ácido periacético, el hipoclorito de sodio, etc., que generalmente son usados para la limpieza y la desinfección en industrias alimentarias. Esta exposición produce en los microorganismos una serie de daños u oxidaciones directas, por ejemplo: oxidación de grupos sulfhidrilo en proteínas, peroxidación de los lípidos, generación de ROS, desequilibrio NAD/NADH, daño al ADN, a las membranas o a las proteínas, etc.

2. Estrés oxidativo secundario: este estrés se produce cuando las células son expuestas a estreses ambientales distintas de los agentes oxidantes directos. El estrés oxidativo secundario se ha declarado como un posible mecanismo común de muerte celular en bacterias con respiración activa y es debido a cambios en el pH, a la acidificación del medio en el que se encuentran las bacterias, a tratamientos térmicos o no térmicos (altas presiones hidrostáticas, pulsos eléctricos de alto voltaje, ultrasonido), a la presencia de agentes tóxicos (antibióticos, alta concentración de NaCl), etc.

Dada la creciente relevancia del estrés oxidativo secundario, durante los últimos años diversos autores han estudiado la relación entre algunos aspectos que modulan el nivel de estrés oxidativo y la inactivación microbiana por diferentes tecnologías. En algunos casos hay evidencias más robustas de esta relación. Así, por ejemplo, Aertsen y col. (2005) observaron que al tratar *E. coli* MG1655 durante 15 minutos a diferentes presiones (0-400 MPa) aumentaba el nivel endógeno de estrés oxidativo, tanto en células en fase exponencial como en fase estacionaria. Para ello midieron la actividad de la enzima fosfatasa alcalina en el interior celular, tal y como habían descrito previamente Prinz y col. (1997). La enzima fosfatasa alcalina es una enzima homodimérica que contiene dos enlaces disulfuro intracatenarios en cada monómero, necesarios para que la molécula sea enzimáticamente activa. Sus resultados evidenciaron que el tratamiento por APH inducía estrés oxidativo, que podía influir en la inactivación celular por APH. No obstante, para otros agentes no siempre se han descrito relaciones directas entre el incremento del nivel de estrés oxidativo y la muerte celular. Para

poder estudiar la presencia de estrés oxidativo dentro de las células en todos estos tratamientos se han utilizado diversas técnicas o enfoques experimentales.

Uno de los más habituales es la comparación de la **recuperación celular en condiciones de anaerobiosis y aerobiosis**. Bromberg y col. (1998) estudiaron el efecto de la presencia de oxígeno a lo largo de la recuperación celular tras el tratamiento térmico. Para ello, tras aplicar un tratamiento térmico a *E. coli* O157:H7 recuperaron estas células en medio líquido en aerobiosis y anaerobiosis, y realizaron un recuento de las células supervivientes a diferentes tiempos. Este estudio confirmó que, tras el tratamiento térmico, el recuento celular siempre era mayor cuando las células se recuperaban en anaerobiosis. Estos autores creen que este efecto podría ser debido a que la presencia de daños subletales en las células aumentaría su sensibilidad a la presencia de oxígeno y, por ello, una recuperación en ausencia de oxígeno permitiría una mejor reparación de las lesiones sufridas por las células durante el tratamiento. Stephens y col. (2000) también describieron cómo la recuperación en condiciones de anaerobiosis de *S. typhimurium* tras un tratamiento térmico facilitaba la recuperación celular. Según estos autores, la presencia de ROS en las células podría producirse mediante dos vías, intracelularmente debido a la actividad de la cadena de transporte de electrones, o extracelularmente debido a la oxidación de los componentes del medio de cultivo.

Por otro lado, Aertsen y col. (2005) demostraron que cuando las células presurizadas eran incubadas en condiciones de anaerobiosis, su supervivencia aumentaba de manera significativa. Estos autores achacaron este efecto a una reducción de la formación endógena de ROS en las células tras el tratamiento por APH, y sugirieron que una importante parte de la población de células moría tras el tratamiento debido al estrés oxidativo endógeno. Este mismo efecto fue observado posteriormente por Kimura y col. (2017) con *E. coli*. Asimismo, Cebrián y col. (2010) observaron cómo *S. aureus* tratado con APH presentaba una mayor recuperación en condiciones de anaerobiosis que en aerobiosis, si bien este efecto parecía depender de la cepa empleada, siendo más relevante en células carentes del factor σ^B , el cual participaría en la prevención y reparación de los daños de origen oxidativo mediante el control de productos con funciones detoxificantes y/o antioxidantes.

En relación a la recuperación tras los tratamientos por PEAV, Cebrián y col. (2007) no observaron diferencias en la recuperación celular en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis tras tratar las células de *S. aureus* con PEAV. Por último, Rowbury (1995) observó que la recuperación tras el tratamiento de acidez era similar en aquellas células previamente crecidas en condiciones de aerobiosis y de anaerobiosis. Este efecto era debido a la inducción del factor

INTRODUCCIÓN

sigma RpoS en condiciones de aerobiosis y del factor RpoD durante el crecimiento en anaerobiosis.

Otro enfoque experimental ha sido la utilización de **medios de tratamiento y recuperación con distinta composición**, mediante la adición de diferentes sustancias antioxidantes, quelantes de ROS o modificadoras del potencial redox. El concepto de antioxidante biológico se refiere a cualquier compuesto que, incluso a bajas concentraciones, es capaz de eliminar o prevenir la oxidación. Algunas de sus funciones implican la disminución del estrés oxidativo o de los daños al ADN. El mantenimiento de la homeostasis redox de la célula es asegurado gracias a los sistemas de defensa antioxidantes del interior celular que incluyen las enzimas antioxidantes endógenas (SOD, catalasa o glutatión peroxidasa) y los compuestos antioxidantes no enzimáticos como el glutatión o compuestos eliminadores de ROS de bajo peso molecular (Pisoschi y Pop, 2015). Así, George y Peck (1998) estudiaron el efecto de la adición de diferentes sustancias oxidantes (ferrocianuro de potasio y 2,6-dicloroindofenol), capaces de aumentar el potencial redox del medio, y reductoras (ditiotreitól), capaces de reducirlo, en la mayor o menor recuperación celular de *E. coli* O157:H7 tras el tratamiento térmico. Estos autores observaron que, en el medio control, sin adición de ninguna sustancia oxidante o reductora, la recuperación era mayor en condiciones de anaerobiosis dado que el potencial redox era negativo (-311 mV), en comparación con la recuperación en aerobiosis (+279 mV). Sin embargo, la adición de sustancias oxidantes en el medio de recuperación en anaerobiosis, y la de sustancias reductoras en aerobiosis, producía un cambio en los potenciales redox de estos medios y, por lo tanto, un cambio en el nivel de recuperación celular. Por todo ello, estos autores concluyeron que la recuperación celular tras el tratamiento depende directamente del potencial redox del medio, siendo un potencial redox bajo mucho más adecuado para la recuperación celular que un potencial redox elevado. Ignatova y col. (2008) observaron que en aquellos medios que poseían un potencial redox positivo la inactivación de *Listeria monocytogenes* cuando las células eran tratadas con calor era menor, en comparación con los medios que poseían un potencial redox negativo. Sin embargo, otros autores observaron el efecto contrario cuando las células de *E. coli* eran sometidas a un tratamiento térmico a diferentes pHs (Riondet y col., 2000), lo que parece indicar que el efecto del potencial redox podría depender de otros factores como el pH, actividad de agua o la presencia de diversos componentes en el medio de tratamiento. Stephens y col. (2000) y Stephens y Mackey (2003) observaron cómo afectaba la adición de diferentes compuestos reductores o antioxidantes (catalasa, SOD, manitol, histidina u oxirasa) a la recuperación tras el tratamiento térmico de *S. typhimurium*. Estos autores describieron

que la adición de estos compuestos no ejercía ningún efecto beneficioso en la recuperación de este microorganismo excepto en el caso de la oxyrasa, que permitía una mayor recuperación. La oxyrasa es un sistema enzimático derivado de fragmentos de la membrana citoplasmática de *E. coli* que permite la eliminación de oxígeno del medio convirtiéndolo en agua, por lo que se considera un potente agente reductor. La acción beneficiosa de este compuesto había sido previamente descrita en *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus faecalis* y *Proteus vulgaris* (Fung, 1992). Además, Czechowicz y col. (1996) observaron que la adición de piruvato, quelante de peróxidos, al medio de recuperación tras el tratamiento de *E. coli* O157:H7 aumentaba su recuperación. Este efecto había sido previamente demostrado por Baird-Parker y Davenport (1965) tras el tratamiento térmico de *Staphylococcus aureus*. Estos autores concluyeron que durante el tratamiento térmico estas células perdían la capacidad para protegerse contra los compuestos tóxicos del oxígeno. Este efecto positivo de la adición de piruvato al medio de recuperación tras el tratamiento térmico también fue demostrado en *Clostridium perfringens* (Hood y col., 1990). Asimismo, estos autores observaron un efecto similar cuando se añadían al medio diferentes sustancias capaces de eliminar radicales hidroxilo (benzoato de sodio, manitol, cisteamina o L-cisteína).

Por lo que respecta a las APH, Aertsen y col. (2005) observaron que la adición al medio de tratamiento de compuestos generadores de especies reactivas del oxígeno (*t*-butilhidroperóxido (*t*-BHP) o plumbagina) conllevaba una mayor inactivación celular, en comparación con las células tratadas en tampón. Por ello, estos autores concluyeron que había una relación entre la inactivación celular por APH y la presencia de especies reactivas del oxígeno durante el tratamiento. Además, Kimura y col. (2017) observaron que la adición de piruvato (0,2 % (p/v)) al medio de recuperación favorecía la recuperación de *E. coli* tras el tratamiento por APH. En cuanto a los PEAV, Ukuku y col. (2010) observaron cómo la adición de piruvato y catalasa al medio de recuperación tras el tratamiento de *E. coli* aumentaba el número de supervivientes. Estos autores creen que este efecto positivo podría ser debido a la eliminación del peróxido de hidrógeno generado durante el tratamiento. Sin embargo estos resultados deben ser usados con cautela dado que son contrarios a los observados por Sagarzazu y col. (2010), quienes sí observaron una reparación de los daños celulares por estrés oxidativo de *C. jejuni*, cuando las células eran tratadas por calor y recuperadas en TSAEL con piruvato. No obstante este efecto no se observaba cuando las células eran tratadas por PEAV. Estos resultados sugieren que el tratamiento por PEAV no produce daños de naturaleza oxidativa o que estos daños no son reparables. Por otra parte, Tanino y col. (2012)

INTRODUCCIÓN

describieron el importante efecto del glutatión en la defensa de *S. cerevisiae* frente a un tratamiento por PEAV. Por último, Masip y col. (2006) describieron cómo el glutatión jugaba un importante papel en la protección de las células frente a otros estreses ambientales, entre los que se encuentra el pH ácido. Así, estos autores observaron cómo las células de *E. coli* presentaban una mayor resistencia al pH ácido en presencia de glutatión, y relacionaron este efecto con un posible papel de este compuesto en la regulación del transporte de los iones K^+ . Este mismo efecto fue observado en *L. lactis* por Zhang y col. (2007). Estos autores introdujeron los genes *gshA* y *gshB*, encargados de la síntesis de glutatión en *E. coli*, en el genoma de *L. lactis* con el fin de promover la síntesis de glutatión en su interior, y observaron cómo este compuesto protegía a este microorganismo frente a tratamientos ácidos.

El uso de **cepas mutantes** deletéreas en genes relacionados con los sistemas de defensa frente al estrés oxidativo también ha sido ampliamente utilizado. Por ejemplo, Mackey y Seymour (1987) observaron una mayor sensibilidad a los tratamientos térmicos de las cepas de *E. coli* mutantes en los genes *recA*, *recB* y *polA*. Sin embargo esta mayor sensibilización desaparecía tras añadir al medio de tratamiento catalasa. Por ello, estos autores creyeron que esta mayor sensibilidad podía ser debida a la generación indirecta de daños en el ADN, debido a mecanismos oxidativos, al reaccionar con peróxido de hidrógeno u otros radicales libres derivados de éste. Además, Benov y Fridovich (1995) observaron que las cepas de *E. coli* deletéreas en los genes *sodA* y *sodB* (superóxido dismutasas) presentaban una mayor sensibilidad a los tratamientos térmicos en aerobiosis. Sin embargo, cuando estos tratamientos se llevaban a cabo en condiciones de anaerobiosis apenas observaban diferencias con respecto a la parental. Estos resultados parecían indicar que la actividad de la enzima SOD es de gran importancia en la defensa celular frente al calor, ya que se encarga de la eliminación de los ROS formados en presencia del oxígeno.

Aertsen y col. (2005) observaron una mayor inactivación por el tratamiento con APH de algunas cepas mutantes en genes relacionados con la protección frente al estrés oxidativo. Así, las cepas deletéreas en los genes *katE* y *katF* (encargados de codificar las enzimas catalasa que catalizan la conversión de H_2O_2 en H_2O y O_2), *oxyR* (encargado de la activación del operón OxyR, que se pone en marcha ante una concentración elevada de H_2O_2 en el interior celular), *soxS* (encargado de la respuesta a la presencia de elevados niveles de radicales superóxido) y *sodAB* (encargados de codificar las enzimas SOD que se encargan de la eliminación de los radicales superóxido) fueron más sensibles a estos tratamientos, indicando la importancia de estos genes en la posterior supervivencia celular y, relacionando el estrés oxidativo con la inactivación de *E. coli* por APH. Del mismo modo, Malone y col. (2006) observaron que la cepa

de *E. coli* deletérea en el gen *dps* era significativamente más sensible que la cepa parental. Estos autores achacan esta mayor sensibilidad a cambios conformacionales del ADN o a la exposición de las células a daños por estrés oxidativo, quizá generados mediante la reacción de Fenton. Malone y col. (2006) también describieron una menor resistencia a las altas presiones en aquellas cepas deletéreas en genes relacionados con el estrés oxidativo (*rpoS*, *katE*, *dps*, *trxA*, *trxB*, *oxyR*, *sodAB* y *soxS*). Por ello, según Mackey y Mañas (2008), el estrés oxidativo parece ser una consecuencia importante del tratamiento por altas presiones de *E. coli*, pero su contribución a la muerte celular depende ampliamente del estado fisiológico de las células y de las condiciones de tratamiento y recuperación. Por último, Charoenwong y col. (2011) describieron la influencia de diferentes genes involucrados en la reparación del ADN y en la respuesta frente al estrés oxidativo de *E. coli* frente a los tratamientos por APH, viendo una mayor inactivación de aquellas cepas deletéreas en los genes *rpoS*, *trxA*, *trxB*, *recA* y *soxS*.

Chalise y col. (2006) utilizaron una cepa de *E. coli* mutante en el gen *soxS* con el fin de estudiar posibles daños oxidativos durante el tratamiento por PEAV del orden de nanosegundos. Estos autores no observaron diferencias en la resistencia al comparar esta cepa con la parental, lo que sugería que, bajo las condiciones estudiadas, no se producía estrés oxidativo. Sin embargo, estos autores no descartaron que la duración del pulso y la intensidad de campo eléctrico aplicada no fuese suficiente para generar especies reactivas del oxígeno en el interior celular.

Dukan y Touati (1996) observaron cómo la resistencia a la acidez, usando ácido hipocloroso para acidificar el medio de tratamiento, de diversas cepas mutantes en genes relacionados con el estrés oxidativo (*rpoS*, *dps*, *katG*, *katE*, *oxyR* o *fur*) era siempre menor en comparación con la cepa parental. Además, Masip y col. (2006) observaron cómo una cepa de *E. coli* mutante en el gen *ghsA*, necesario para la síntesis de glutatión, presentaba una mayor inactivación frente a los tratamientos ácidos. Dado que estos autores relacionaron la mayor protección del glutatión frente a estos tratamientos con la implicación de este compuesto en la regulación del transporte de iones K^+ , concluyeron que esta menor supervivencia al tratamiento ácido de esta cepa mutante podría ser debida a una incapacidad para mantener el nivel óptimo de iones K^+ en el interior celular.

También existen estudios de genómica y transcriptómica centrados en el estudio de **genes involucrados** en la supervivencia de los microorganismos a los diferentes tratamientos. Runde y col. (2014) demostraron que el factor de transcripción Spx, encargado de actuar como activador de promotores específicos para el control redox, estaba relacionado con el control

INTRODUCCIÓN

del estrés oxidativo en *B. subtilis* y a su vez aumentaba la supervivencia de este microorganismo frente al tratamiento térmico. Este regulón controla genes importantes involucrados en el mantenimiento de la homeostasis y el potencial redox intracelular, por ejemplo, el gen *trxA*. Esto mismo había sido observado previamente por Hecker y Völker (2001) y Hecker y col. (2007) en *B. subtilis*. Por otro lado, Malone y col. (2006) observaron que los tratamientos por APH ponían en marcha los sistemas de respuesta generales de estrés (SOS) y los sistemas de respuesta al estrés oxidativo en *E. coli* O157:H7. Además, estos autores estudiaron los genes cuya actividad se veía aumentada cuando las células eran tratadas por APH. Algunos de ellos estaban relacionados con el estrés oxidativo, como es el caso de los genes involucrados en los sistemas glutarredoxina y tiorredoxina (*trxAC* y *grxA*) o algunos reguladores transcripcionales de la respiración aerobia-anaerobia y el control del hierro intracelular (*fur*). Inaoka y col. (2017) demostraron que la activación de los genes que codifican para la enzima SOD en las células vegetativas de *B. subtilis* aumentaba su resistencia a las APH, mientras que la activación de los genes que codifican la enzima catalasa no ejercía ningún efecto significativo. Además, Tanino y col. (2012) observaron que la exposición de *S. cerevisiae* a un tratamiento por PEAV (2-4 kV/cm) inducía la expresión de los genes de respuesta al estrés oxidativo, especialmente aquellos que codificaban las enzimas de síntesis de glutatión y aquellos que codificaban la enzima superóxido dismutasa, todas ellas encargadas de eliminar los radicales libres. Por último, Mols y col. (2010) observaron que cuando *B. subtilis* era sometido a un estrés ácido se expresaban ciertos genes relacionados con el estrés oxidativo. Por ejemplo, el gen *perR* (regulador mayoritario de la respuesta al estrés oxidativo) u otros genes involucrados en el estrés oxidativo como *sodA* y *katB*. La inducción de estos genes indicaba que un bajo pH podría inducir la formación de compuestos oxidativos como el peróxido de hidrógeno. Bore y col. (2007) también observaron un aumento en la actividad enzimática de la enzima SOD, regulada por el gen *sodA*, y de la enzima catalasa, regulada por el gen *kata*, lo que indicaba una conexión entre la respuesta al tratamiento ácido y la respuesta al estrés oxidativo en *S. aureus*. Además, estos autores también observaron un aumento en la regulación de los genes *aphC* y *aphF*, que codifican la actividad de la enzima alcohol hidropéroxido reductasa, la cual protege a las células contra los radicales OONO^\cdot . Por último, estos autores también observaron un aumento en la expresión de los genes *trxA* y *trxB*, encargados del sistema tiorredoxina, de vital importancia para la protección de las células contra las especies reactivas del oxígeno, ya que mantienen el equilibrio tiol-disulfuro intracelular.

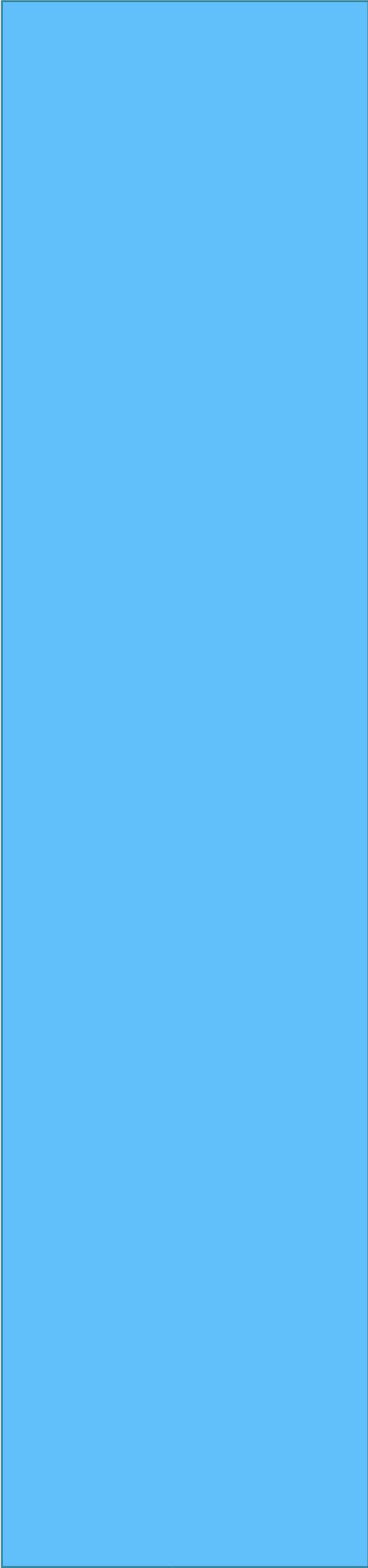
Finalmente, existe un número limitado de estudios en los que se detecta directamente la presencia de niveles anormalmente elevados de distintos ROS y RNS dentro de las células mediante **tinción con diferentes fluorocromos**. Así, Baatout y col. (2005) describieron cómo el tratamiento a elevadas temperaturas de *E. coli* producía un aumento significativo de ROS, al teñir las células con HE (hidroetidio). Del mismo modo, Altenburger (2009) observó, mediante la tinción con DHR 123 (Dihydrorodamina, colorante usado para detectar peróxido de hidrógeno), que durante el tratamiento térmico de *E. faecium* se producían ROS. Además describió un aumento de los mismos conforme se aumentaba la temperatura de tratamiento. Sin embargo este autor observó que para una misma temperatura el tratamiento prolongado en el tiempo provocaba una disminución en el porcentaje de células teñidas. Mols y col. (2011) observaron cómo el tratamiento térmico aplicado sobre *Bacillus cereus* provocaba la formación de radicales superóxido, mediante la tinción con el colorante MitoSOX. Pakhomova y col. (2012) observaron que conforme se aumentaba el número de pulsos y/o el voltaje aplicado al que se sometía a las células Jurkat (células eucariotas) se detectaba una mayor tinción con H₂DCFDA (colorante ampliamente utilizado para detectar estrés oxidativo general en el interior celular). Sin embargo la adición de catalasa o SOD + catalasa junto con el colorante H₂DCFDA provocaron una disminución de la tinción, indicando que la acción de estas enzimas disminuía los ROS generados durante los tratamientos por PEAV. Por último, Baatout y col. (2007) observaron cómo tras tratamientos a pH ácidos (pH 2,0) las células de *E. coli* presentaban una elevada tinción con HE. Además, Watanabe y col. (2012) describieron que las condiciones de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* influían posteriormente en la mayor o menor resistencia de este microorganismo a un tratamiento ácido. Los resultados obtenidos por estos autores mostraron que las células crecidas en condiciones de anaerobiosis, metabolismo fermentativo, mostraban una mayor resistencia a la acidez que las células crecidas en condiciones de aerobiosis. Por ello, con el fin de obtener una mayor información sobre el efecto de la acidez en este microorganismo, estos autores estudiaron la presencia de radicales superóxido mediante la tinción con dihidroetidio (DHE), observando una mayor formación de radicales cuando las células eran sometidas a pHs más ácidos.

Cómo se puede desprender de todo lo descrito en este apartado, actualmente hay bastantes evidencias de la relación entre la inactivación celular mediante diferentes tecnologías de conservación de los alimentos (calor, APH, PEAV y acidez) y un incremento en el nivel de estrés oxidativo. Sobre todo en el caso de calor (Bromberg y col., 1998; George y Peck, 1998; Ignatova y col., 2008) y en el caso de las APH (Aertsen y col., 2005; Malone y col., 2006; Kimura y col., 2017), aunque hay también diversos estudios sobre su efecto en PEAV y acidez.

INTRODUCCIÓN

Sin embargo, aunque parece que el estrés oxidativo está implicado en la muerte celular por estas tecnologías y parece un mecanismo común en todas ellas, los datos obtenidos hasta el momento son datos aislados, con microorganismos diferentes y en condiciones experimentales muy variables, que no son suficientes para detallar su modo de acción y su implicación en la inactivación celular. Probablemente la dificultad para obtener unos datos concluyentes reside en las diferencias obtenidas por los diversos autores, ya que como se deduce de la lectura de este apartado, hay diversas contradicciones dependiendo de la tecnología utilizada, de las condiciones de tratamiento y del microorganismo objeto de estudio; y en la falta de estudios acerca de los factores que pueden estar influyendo en la generación, control y eliminación de especies reactivas del oxígeno. Por todo ello, son necesarias más investigaciones con el fin de confirmar si existe una relación entre el estrés oxidativo y las diferentes tecnologías de conservación de los alimentos, y si la generación de ROS y su posterior control están relacionados con la inactivación y la supervivencia celular en todas ellas. Así, un buen conocimiento de los mecanismos implicados permitiría diseñar tratamientos adecuados para la eliminación de los diferentes microorganismos presentes en los alimentos.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



Tanto las tecnologías utilizadas tradicionalmente en la Industria Alimentaria para la conservación de los alimentos como las nuevas tecnologías desarrolladas a lo largo de los últimos años tienen como objetivo obtener alimentos que cumplan con las características sensoriales y organolépticas demandadas por el consumidor y que, a su vez, sean estables y seguros. Para conseguir un máximo aprovechamiento de las tecnologías disponibles y de sus posibles combinaciones, es necesario conocer cómo interaccionan con los microorganismos patógenos y alterantes presentes en los alimentos, y utilizar ese conocimiento como base para un buen diseño de procesos.

Aunque se han realizado importantes avances en los últimos años, el conocimiento acerca del modo de acción de las tecnologías de inactivación microbiana sigue siendo parcial. Entre los aspectos de la fisiología bacteriana que tienen importancia para la inactivación y/o supervivencia celular, el estrés oxidativo está generando interés en los últimos años. El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre las sustancias prooxidantes y antioxidantes en el interior celular en favor de las primeras, hecho que podría derivar de la aplicación de diferentes tratamientos tecnológicos, e interferir con la supervivencia celular. El papel del estrés oxidativo frecuentemente se ha infravalorado y no se ha estudiado suficientemente y de manera sistemática.

Por ello, esta investigación se planteó con el **objetivo general** de determinar si la exposición de las bacterias a diferentes agentes utilizados en la conservación de los alimentos podría provocar desequilibrios en el mantenimiento del equilibrio oxidativo, constituyendo un mecanismo común que podría contribuir a la inactivación celular. Este estudio se encuadra dentro de una línea de investigación a largo plazo que pretende avanzar en el conocimiento básico acerca de los aspectos fisiológicos relevantes para la inactivación bacteriana en el ámbito de la Tecnología de los Alimentos.

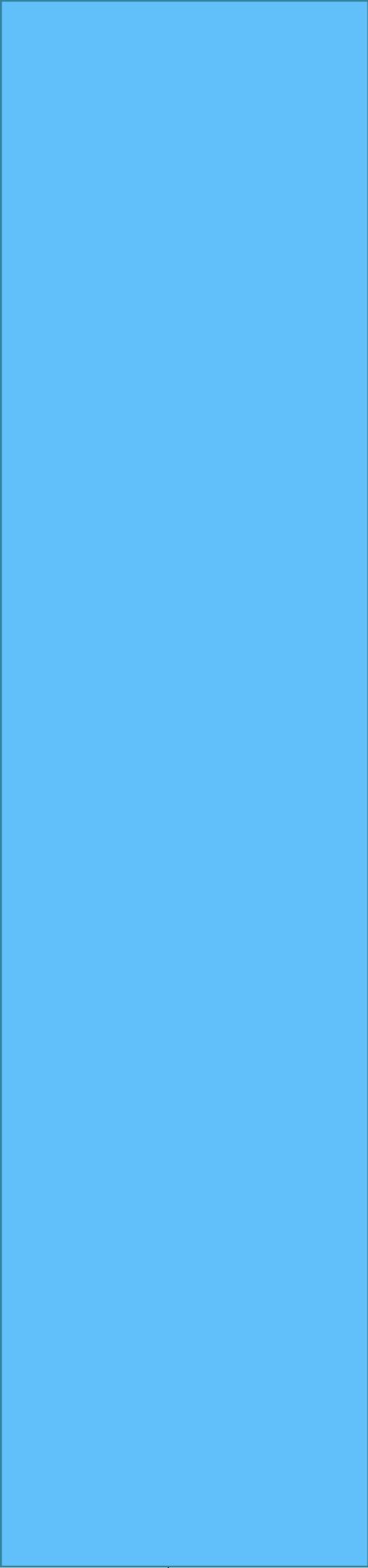
Los **objetivos parciales** que se plantearon fueron:

- Poner a punto técnicas para estimar la presencia de desequilibrios oxidativos: estimación directa de niveles elevados de especies oxidantes y estimación del daño subletal de naturaleza oxidativa.
- Determinar si los tratamientos tecnológicos de diferente naturaleza, calor, altas presiones, pulsos eléctricos y acidez, provocan la aparición de desequilibrios oxidativos, bajo diferentes condiciones experimentales. Estudiar su origen y relevancia.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

- Establecer si existe relación entre el desequilibrio oxidativo, la presencia de otras alteraciones celulares y la inactivación.
- Estudiar si existe un daño subletal de naturaleza oxidativa, y evaluar su importancia en la supervivencia celular.

MATERIAL Y MÉTODOS



3.1 MICROORGANISMOS

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron las especies y cepas detalladas en la tabla 3.1. Todas las cepas se conservaron en crioviales (Maintenance Freeze Medium -064-TA0124, Scharlau Chemie, Barcelona, España) a -80°C.

Tabla 3.1. Microorganismos utilizados en esta Tesis Doctoral.

Microorganismos	Características más relevantes	Referencias
<i>Escherichia coli</i> BW25113	Cepa utilizada para la creación de la colección KEIO. Gram negativo. Aero-anaerobio facultativo.	Datsenko y Wanner, 2000
<i>Escherichia coli</i> BW25113 JW0013 (Δ DnaK:kan)	Mutante en el gen <i>dnaK</i> (reparación de proteínas mal plegadas)	Baba y col., 2006
<i>Escherichia coli</i> BW25113 JW2669 (Δ RecA:kan)	Mutante en el gen <i>recA</i> (reparación de lesiones en el ADN)	Baba y col., 2006
<i>Escherichia coli</i> W3110 (CECT 416)	Cepa tipo <i>E. coli</i> , muy utilizada en estudios de fisiología	
<i>Escherichia coli</i> CECT 471		
<i>Escherichia coli</i> BJ4		
<i>Escherichia coli</i> CECT 4201		
<i>Escherichia coli</i> MG1655	Cepa tipo <i>E. coli</i> , muy utilizada en estudios de genética y fisiología.	Hayashi y col., 2006
<i>Escherichia coli</i> MG1655 Δ gshA	Cepa mutante en el gen <i>gshA</i> (síntesis de glutatión)	Construcción propia
<i>Escherichia coli</i> MG1655 pACYC184	Cepa parental con el plásmido vacío pACYC184 en su interior	Construcción propia
<i>Escherichia coli</i> MG1655 pACYC184- <i>gshF</i>	Cepa capaz de sobreexpresar el gen <i>gshF</i> (síntesis de glutatión)	Construcción propia
<i>Salmonella enterica</i> serovar Senftenberg 775W	Cepa termorresistente. Gram negativo. Aero-anaerobio facultativo.	
<i>Lactobacillus plantarum</i> CECT 748	Gram positivo. Anaerobio aerotolerante.	
<i>Bacillus subtilis</i> CECT 4524	Esporulado mesófilo. Aerobio estricto.	

3.2 MEDIOS DE CULTIVO Y DE TRATAMIENTO

Como **medio de crecimiento** de las diferentes cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella* se utilizó agar tripticasa-soja (TSA) y caldo tripticasa-soja (TSB) suministrados por la firma Oxoid (Madrid, España), y se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante. Ambos medios se suplementaron con 0,6 % p/v de extracto de levadura (EL, Oxoid) (TSAEL, TSBEL).

Para *Lactobacillus plantarum* se utilizó agar MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) y caldo MRS suministrados también por la firma Oxoid y preparados siguiendo las instrucciones del

MATERIAL Y MÉTODOS

fabricante. Por último, para obtener la suspensión de *Bacillus subtilis* se utilizó medio 2xSG (Leighton y Doi, 1971) (Tabla 3.2) en forma líquida.

Tabla 3.2. Composición del medio de esporulación 2xSG (por litro).

2xSG caldo
16 g Caldo nutritivo
2 g KCl
0,5 g MgSO ₄ *7H ₂ O
Ajustar a pH 7,0 y adicionar:
1 mL 1 M Ca(NO ₃) ₂
1 mL 0,1 M MnCl ₂
1 mL 1 mM FeSO ₄
2 mL Glucosa al 50 % (p/v)

En el caso de las células vegetativas, como **medio de tratamiento** se usó PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma Aldrich, Milán, Italia), para los estudios realizados con calor y APH, que se preparó según las indicaciones del fabricante. Para los estudios realizados con PEAV se usó tampón citrato-fosfato (McIlvaine) pH 7,0 con una conductividad de 1 mS, y en el caso de los tratamientos de acidez se usó TSBEL acidificado hasta el pH deseado, con ácido láctico (Panreac, Barcelona, España). Por otro lado, para los estudios de calor llevados a cabo sobre esporos se usó tampón citrato-fosfato (McIlvaine) a diferentes pHs (4,0, 5,5 y 7,0).

Ocasionalmente se añadieron al medio de tratamiento diferentes compuestos con actividad redox como L-cisteína HCl (10 mM) (Sigma Aldrich), L-glutatión reducido (10 mM) (Sigma Aldrich), 2,2'-dipiridil (0,02 mM) (Sigma Aldrich), tiourea (150 mM) (Sigma Aldrich), tiron (4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic acid disodium salt monohydrate; 20 mM) (Sigma Aldrich), D-manitol (50 mM) (Sigma Aldrich) y piruvato de sodio (9 mM) (Panreac) (Kari y col., 1971; Ferguson y Booth, 1998; Yang y col., 2001; Santo y col., 2008; Wang y col., 2010; Johnson y col., 2014). Las concentraciones añadidas se escogieron de acuerdo a lo publicado en la literatura científica, previa comprobación de que no ejercía un efecto inhibitor en el crecimiento microbiano (ver sección 4.1).

Como **medio de dilución** se usó MRD (Maximum Recovery Diluent, Oxoid), disolviendo 1 % p/v en agua destilada. Y, por último, como **medio de recuperación** estándar se usó TSAEL, para recuperar *E. coli* y *Salmonella*; MRS para recuperar *L. plantarum*; y agar nutritivo (AN,

Oxoid), en el caso de *B. subtilis*. Ocasionalmente se añadieron al medio de recuperación otros compuestos, tal y como se indica en el apartado 3.5.

Todos los medios se esterilizaban en un autoclave a 121°C durante 20 minutos (modelo Certoclav CV 2000/l, Traun, Suiza). Los componentes termosensibles (glucosa, CaCl₂, MgSO₄·7H₂O, manitol, tiron, piruvato, cisteína, tiourea, glutatión, dipiridil) se añadían una vez el agar estéril se había atemperado a 45°C, esterilizados por filtración a través de un filtro de 0,22 µm.

3.3 SUSPENSIONES DE TRABAJO Y CURVAS DE CRECIMIENTO

Suspensiones de trabajo

A partir de un criovial almacenado en congelación (-80 °C) se sembraron placas de TSAEL, para *E. coli* y *S. senftenberg*, y de MRS agar, para *L. plantarum*, por agotamiento en estría que se incubaron durante 18-24 horas a 37°C (±1°C). En el caso de *L. plantarum* siempre se incubó en anaerobiosis (90 % N₂, 5 % CO₂ y 5 % H₂) (Macs Vac500 Microaerophilic Workstation, Don Whitley Scientific, UK). A partir de una colonia aislada se sembraron frascos que contenían 10 mL de TSBEL o MRS caldo estériles que se incubaron durante 12 horas a 37°C (±1°C) en agitación (agitador modelo Vibramax 100, Heidolph Instruments GMBH & Co. KG, Scwabach, Alemania). Tras determinar la concentración celular de este precultivo mediante recuento microscópico (Nikon Eclipse E400, Nikon Corporation, Japón) en cámara de Thoma, se inocularon frascos con 50 mL de TSBEL o MRS caldo esterilizado, con una concentración inicial de 10⁶ microorganismos/mL. Tras la siembra, los frascos se incubaron en una estufa de aire forzado (Modelo Hotcold UL, Selecta, Barcelona, España) a 37°C (±1°C), hasta alcanzar la fase exponencial, tras 2,5 horas, o estacionaria de crecimiento, tras 18-24 horas. Cuando se indique en el texto y con el fin de estudiar la influencia de las condiciones de crecimiento, tanto los cultivos de *E. coli*, en fase exponencial y estacionaria, como los de *L. plantarum* se crecieron en condiciones de aerobiosis o anaerobiosis.

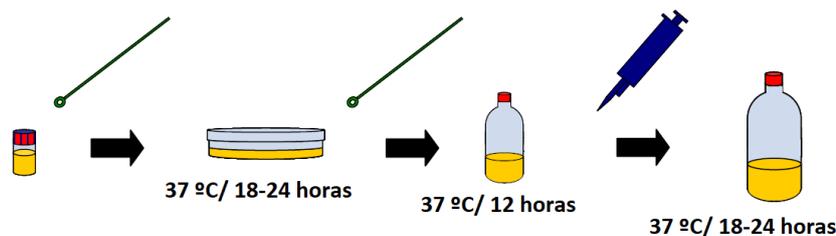


Figura 3.1. Metodología utilizada para la obtención de las suspensiones en fase estacionaria.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la obtención de las suspensiones de *B. subtilis*, a partir del criovial a -80°C se realizó una siembra por agotamiento en estría en una placa de agar nutritivo que se incubó a 30°C durante 18-24 h. A partir de una colonia aislada se sembró un frasco que contenía 10 mL de caldo 2×SG estéril que se incubó durante 18-24 horas a la temperatura de 30°C . La esporulación se realizó en medio líquido. Para ello se determinó la concentración celular del precultivo mediante un recuento microscópico en cámara de Thoma y se inocularon frascos con 50 mL de 2×SG líquido con una concentración inicial de 10^5 ufc/mL. A lo largo del tiempo de esporulación, se realizó un seguimiento de la curva de crecimiento mediante recuento en placa y se siguió la curva de esporulación hasta los 7 días, se recogió y se aplicó un tratamiento de $80^{\circ}\text{C}/10$ minutos para inactivar las células vegetativas que pudiera haber. Tras este tratamiento se centrifugó dos veces en una centrifuga Heraeus (mod. Megafuge 1.0R, Hanau, Alemania) a 4000 r.p.m. durante 20 minutos y a 4°C , resuspendiendo los esporos en agua destilada estéril.

Curvas de crecimiento

Para elaborar las curvas de crecimiento se extrajeron a intervalos predeterminados de tiempo 0,1 mL de muestra de los frascos de 50 mL en incubación. Tras realizar las correspondientes diluciones decimales en MRD, se sembraron las placas de TSAEL, para la obtención de las curvas de crecimiento de *E. coli* y *S. senftenberg*, y MRS agar, para obtener la de *L. plantarum*, por homogeneización en masa, que se incubaron durante 18-24 horas a 37°C . El número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) se estimó a partir de los recuentos obtenidos en cada placa correspondiente a cada dilución, de al menos dos diluciones decimales consecutivas. Las curvas de crecimiento se elaboraron representado el logaritmo del número de UFC/ mL frente al tiempo de incubación.

En determinadas ocasiones, para poder comparar el efecto de la adición de diferentes compuestos en la velocidad de crecimiento, se elaboraron curvas de crecimiento midiendo la absorbancia en lugar del recuento en placa. Para ello se inoculó una concentración conocida de cada uno de los microorganismos objeto de estudio en pocillos de una placa de 96 pocillos – “microtiter” -, en los cuales se habían depositado previamente 200 microlitros del medio de crecimiento TSBEL o del mismo caldo al que se le había adicionado diferentes sustancias, por ejemplo sustancias con actividad de óxido-reducción, antibióticos, ácidos, etc. Esta placa se incubó en agitación, y a intervalos predeterminados de tiempo se realizaron medidas de la absorbancia a 620 nm de cada pocillo en un espectrofotómetro (Labsystems Multiskan MS 352).

Por otro lado, durante la obtención de la suspensión de *B. subtilis* se realizó un seguimiento del porcentaje de esporulación a lo largo del tiempo. La figura 3.2 muestra los recuentos microscópicos y en placa, antes y tras un tratamiento térmico, de *Bacillus subtilis* y el porcentaje de esporulación a lo largo del tiempo.

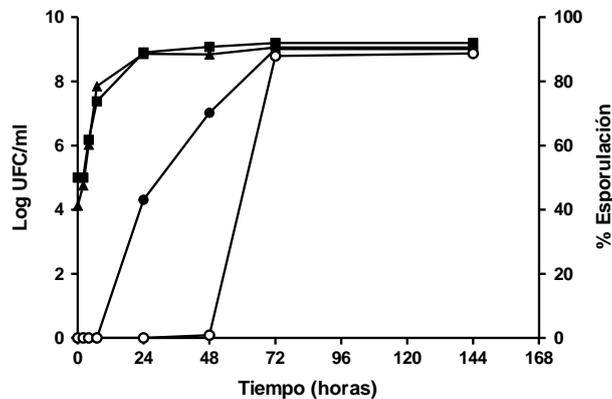


Figura 3.2. Curvas de crecimiento obtenidas mediante recuento microscópico (■) y recuento en placa antes (▲) y tras un tratamiento térmico (80°C/10 min) (●) y porcentaje de esporulación (○) de *B. subtilis* en medio 2xSG (Guillén, 2017).

3.4 DETERMINACIONES DE RESISTENCIA

3.4.1 Determinaciones de resistencia al calor

La determinación de la resistencia al calor se llevó a cabo de tres maneras diferentes, según el experimento a realizar. Por un lado, algunos experimentos se realizaron en el termorresistómetro TR-SC (Condón y col., 1993) modificado (Equipo Mastía, Universidad Politécnica de Cartagena) (Conesa y col., 2009).

Como se puede observar en el esquema presentado en la figura 3.3, el equipo consta de un cuerpo principal compuesto por una cámara cilíndrica (A), de acero inoxidable de 400 mL de capacidad, cerrada por la parte superior con una tapa enroscable, también de acero inoxidable. La tapa cuenta con varios orificios que permiten la entrada de distintos elementos a la cámara de tratamiento: el eje de agitación (B), conectado en el exterior a un motor de velocidad regulable, el cual se encarga de homogeneizar continuamente el contenido de la cámara de tratamiento permitiendo una distribución uniforme de los microorganismos al igual que un calentamiento homogéneo del medio; la resistencia eléctrica (C) de 1200 W conectada al módulo electrónico de termostatación; el sistema de refrigeración (D), constituido por un serpentín de acero inoxidable conectado a la red de agua corriente y regulado por una

MATERIAL Y MÉTODOS

electroválvula conectada al módulo electrónico de termostatación; la entrada de presión (E), por la que a partir de una bombona de N₂ y mediante la regulación con un manorreductor se aporta la presión deseada, gracias a la cual permite el trabajo a temperaturas superiores a la temperatura de ebullición del medio de tratamiento sin que éste llegue a hervir; la toma de muestras (F) se lleva a cabo a través de un tubo de acero inoxidable conectado en el extremo distal a otro de silicona controlado mediante una válvula solenoide; y la entrada para la sonda de control de temperatura, que consiste en una sonda Termopar (G) (modelo Crison Thermometer 639K, Crison Instruments S.A., Alella, España) que se encuentra conectada al módulo electrónico de control la cual se encarga de medir y controlar la temperatura de tratamiento. Por último, el equipo también posee un dispositivo de inyección (H) que permite inocular la muestra a tratar. El inyector, ubicado en la parte inferior de la cámara, está cerrado por un septum de cromatografía que permite inyectar la suspensión con una jeringuilla automática (CR-700-200 Hamilton Co., Reno, Nevada, E.E.U.U.).

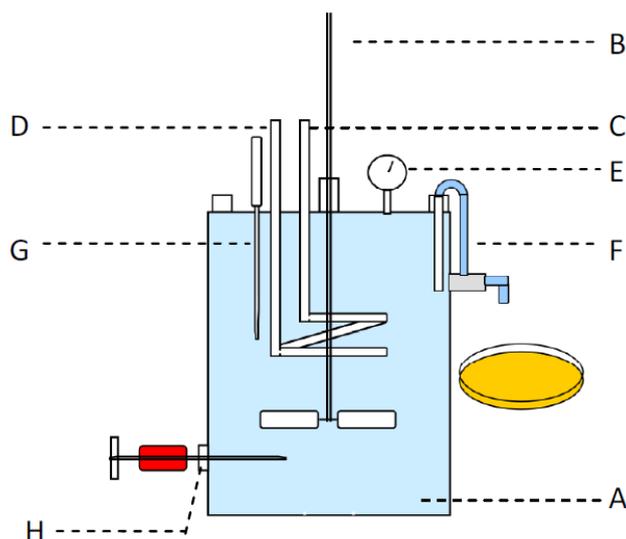


Figura 3.3. Esquema del termostatómetro: (A) Cámara de tratamiento; (B) Eje de agitación; (C) Resistencia eléctrica; (D) Circuito de refrigeración; (E) Entrada de presión; (F) Sistema de toma de muestras; (G) Sonda termopar; (H) Puerto para inocular.

Antes y después de cada sesión de trabajo se esterilizó (15 minutos a 125°C) tanto el equipo como el medio de tratamiento. Una vez el medio de tratamiento (400 mL) estaba estéril y estabilizado a la temperatura de tratamiento, se inyectaron 0,2 mL de la suspensión microbiana, adecuadamente diluida, con la jeringuilla previamente desinfectada con etanol y agua destilada estéril, y a periodos predeterminados de tiempo se extraían las muestras del volumen deseado (normalmente 0,2 mL) directamente en placas de Petri estériles.

Inmediatamente se añadía el medio de recuperación estéril, fundido y a 45°C. Las placas se homogeneizaban y posteriormente se incubaban.



Figura 3.4. Termorresistómetro utilizado para las determinaciones de resistencia al calor.

En algunas ocasiones, los tratamientos de calor se llevaron a cabo en tubos de vidrio sumergidos en un baño de agua termostatado. El objetivo de estos experimentos fue obtener concentraciones elevadas de células tratadas, $\geq 10^7$ células/mL, para posteriormente poder examinar estas muestras al microscopio, ya que, normalmente, la concentración celular usada en el termorresistómetro resulta insuficiente para lograr este propósito. En este caso, los tubos de vidrio, que contenían 4,5 mL del medio de tratamiento, se sumergieron en un baño de agua termostatado y en agitación (Baño con agitación BTG, Bunsen, Madrid, España) y se estabilizaron a la temperatura deseada. La temperatura se monitorizó mediante una sonda termopar (Modelo FTA-15P, Ahlborn, Holzkirchen, Alemania) sumergida en un tubo control con el mismo volumen final que las muestras a tratar, la cual estaba conectada a un módulo colector de datos, data logger (Modelo Almemo 2590, Ahlborn) que permitía el registro de la temperatura. Tras la estabilización de la temperatura del medio de tratamiento se inoculó 0,5 mL de la dilución correspondiente del microorganismo a estudiar, y, a lo largo del tratamiento, se realizó la extracción de 0,1 mL a intervalos de tiempo predeterminados. Tras las diluciones decimales correspondientes, se sembraron en el medio de recuperación estéril, fundido y a 45°C, para su posterior incubación, recuento y representación.

Por último, en ciertas ocasiones, cuando se indique en el texto, el tratamiento térmico se llevó a cabo en un equipo que principalmente consiste en un termobloque de aluminio con capacidad para 96 tubos de plástico de 1,2 mL (Incubador FX, Zeulab, Zaragoza, España). Tras la selección de la temperatura deseada, controlada por un módulo electrónico, se precalentaron 900 μ L del medio de tratamiento en los tubos de plástico y se inocularon 100 μ L

MATERIAL Y MÉTODOS

de la suspensión elegida, previamente diluida hasta la concentración deseada. A intervalos de tiempo predeterminados se extrajo 0,1 mL para su dilución, siembra y posterior incubación, recuento y representación. Este sistema permitía realizar tratamientos en condiciones de atmósfera de anaerobiosis en el interior de la cámara de atmósfera variable.



Figura 3.5. Tratamiento térmico en un baño termostático con agitación (A) o en un termobloque de aluminio (B).

3.4.2 Determinaciones de resistencia a las APH

Los experimentos se realizaron en un equipo de APH de Stansted Fluid Power modelo S-FL-085-09-W (Harlow, London, England), que permite alcanzar una presión máxima de trabajo de 800 MPa.

El equipo dispone de una cámara de tratamiento de 30 mL de capacidad cuya temperatura se puede controlar con una camisa de refrigeración conectada a un baño termostático externo. Como fluido de presurización se utilizó una mezcla de agua destilada y propilenglicol (Gilca, Zaragoza, España) (50:50, v/v). La velocidad de compresión fue de aproximadamente 242 MPa/min y el tiempo de descompresión fue inferior a 10 s. Durante el tiempo de tratamiento se produjo un calentamiento adiabático que, en este estudio, nunca supuso que la temperatura de la muestra superase los 40°C.



Figura 3.6. Fotografía del equipo usado para la aplicación de tratamientos de APH.

Para llevar a cabo los experimentos, previamente a los tratamientos de APH, las suspensiones microbianas se centrifugaron y diluyeron en el medio de tratamiento (generalmente PBS), hasta obtener la concentración de trabajo deseada (alrededor de 10^8 células/mL). La dilución que contenía la concentración de trabajo se introdujo en una bolsa de plástico (alrededor de 4x4 cm) de polietileno estéril (Coimbra Pack S.L., Zaragoza, España) que se termoselló (Termoselladora Modelo KT-300 HC, Comecta S.A., Barcelona, España) eliminando las posibles burbujas de aire. Estas bolsas fueron sometidas posteriormente a los tratamientos de presurización. Tras el tratamiento las bolsas fueron abiertas con tijeras previamente esterilizadas y las muestras se extrajeron para su posterior análisis, siembra, incubación y recuento.

Para los experimentos realizados en el laboratorio de Microbiología de los Alimentos durante la estancia en la Universidad Católica de Lovaina (KU Leuven, Lovaina, Bélgica) se utilizó un equipo modelo HPIU-10.000, 95/1994 (Resato, Roden, Holanda) con capacidad para alcanzar hasta 1000 MPa de presión. Se trata de un equipo que genera la presión de tratamiento de forma indirecta, mediante el uso de un intensificador. La utilización del circuito de baja presión permitía alcanzar 100 MPa mientras que el intensificador aumentaba esta presión hasta el valor deseado. Disponía de 8 cámaras de tratamiento en paralelo, de 8 mL de capacidad, que podían ser presurizadas simultáneamente y descomprimidas individualmente, y cuya temperatura se controlaba mediante un circuito de refrigeración-calefacción externo conectado a un baño termostático. Como fluido de presurización se utilizó una mezcla de aceite y glicol (TR15, Van Meeuwen, Weesp, Holanda).

El procedimiento utilizado para el tratamiento de las muestras fue el mismo que se ha explicado anteriormente.



Figura 3.7. Equipo de tratamiento para las altas presiones hidrostáticas (KU Leuven, Lovaina, Bélgica).

3.4.3 Determinaciones de resistencia a los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEAV)

Para la determinación de la resistencia a los PEAV se utilizó un equipo suministrado por la empresa ScandiNova (Modulator PG, ScandiNova, Uppsala, Suecia), cuyo esquema eléctrico se muestra en la figura 3.8. El equipo consta básicamente de un transformador (DCPS D10-400, ScandiNova) que convierte la corriente trifásica alterna (380 V, 16 A) en corriente continua de 1 kV, la cual es transferida a 6 interruptores IGBT conectados en serie (Switch rack SR-6, ScandiNova). Una señal eléctrica externa (TTL, 5 V) controla la apertura y cierre de los módulos IGBT, provocando la descarga de la corriente de 1 kV en una primera señal de onda cuadrada. Finalmente, un transformador de pulso (Pulse transformer, ScandiNova) convierte esa primera señal pulsante en la señal de alto voltaje deseada.

Con este circuito, el equipo es capaz de generar pulsos de onda cuadrada de 3 μ s de duración de hasta 30 kV de voltaje y 200 A de intensidad, a una frecuencia de hasta 300 Hz. El equipo está diseñado para trabajar con una cámara de tratamiento con una resistencia eléctrica óptima entre 100 y 170 Ω . En estas condiciones se consigue un pulso totalmente cuadrado, en el que el voltaje aumenta hasta el valor establecido y, una vez terminado el pulso, desciende hasta voltaje cero. A lo largo de toda la duración del pulso, el voltaje alcanzado oscila menos de un 2 %.

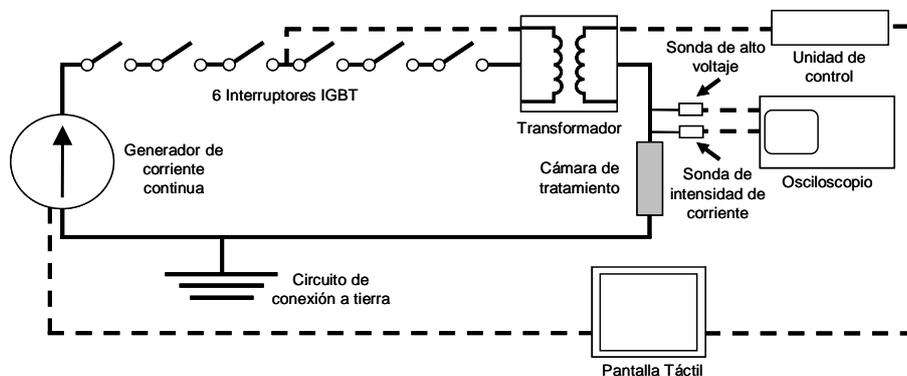


Figura 3.8. Configuración eléctrica del equipo de PEAV.

La cámara de tratamiento consistió en un tubo de polietileno cerrado en sus extremos por dos cilindros de acero inoxidable. La distancia entre los electrodos era de 0,25 cm y el área del electrodo de 2,01 cm². Se aplicaron tratamientos de hasta 300 μ s, con una duración de pulso de 3 μ s, a una intensidad de campo eléctrico de 20, 25 y 30 kV/cm que correspondía a una energía específica por pulso de 1,2, 1,9 y 2,7 kJ/kg, respectivamente. La frecuencia de aplicación de los pulsos fue de 0,5 Hz. Durante la aplicación de los tratamientos, parte de la

energía eléctrica generada se disipa en forma de calor. Para evitar el sobrecalentamiento del sistema, el equipo posee un sistema de refrigeración mediante aceite dieléctrico de baja conductividad eléctrica que circula por el interior de los electrodos de la cámara de tratamiento. Dicho aceite es enfriado mediante un intercambiador de calor en el que el fluido refrigerante es agua. Durante todo el tratamiento la temperatura se mantuvo por debajo de 40°C, asegurando así que la inactivación producida se debía al tratamiento por PEAV.

Previamente al tratamiento, se centrifugó la suspensión microbiana durante 5 minutos a 10.000 rpm y se resuspendió en tampón citrato-fosfato (McIlvaine) de pH 7,0 y 1 mS/cm de conductividad. Una vez resuspendida se inoculó en la cámara de tratamiento con una jeringuilla estéril y se selló la cámara con cinta adhesiva. Tras el tratamiento se extrajo la muestra con una jeringuilla estéril y se realizaron, en caso de ser necesarias, las correspondientes diluciones decimales, previas a la siembra, incubación y recuento de supervivientes.

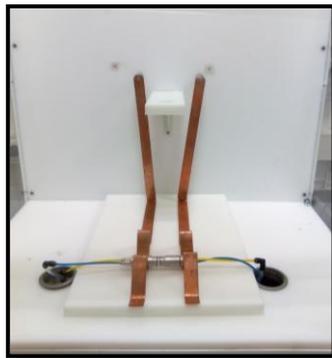


Figura 3.9. Equipo de PEAV utilizado a lo largo de esta Tesis Doctoral.

3.4.4 Determinaciones de resistencia a la acidez

Como medio de tratamiento se utilizó TSBEL previamente esterilizado en autoclave y acidificado con ácido láctico hasta alcanzar el pH deseado (generalmente pH 3,0). Una vez ajustado el pH se procedió a su esterilización por filtración (filtros de 0,22 μm). Las determinaciones de resistencia se llevaron a cabo en un equipo termostático a 25°C (Incubador FX, Zeulab). Para ello, se trató una concentración de 10^8 células/mL y a intervalos de tiempo determinados se extrajeron muestras de 100 μL que, tras realizar las diluciones decimales correspondientes se sembraron en placa para su posterior recuperación.

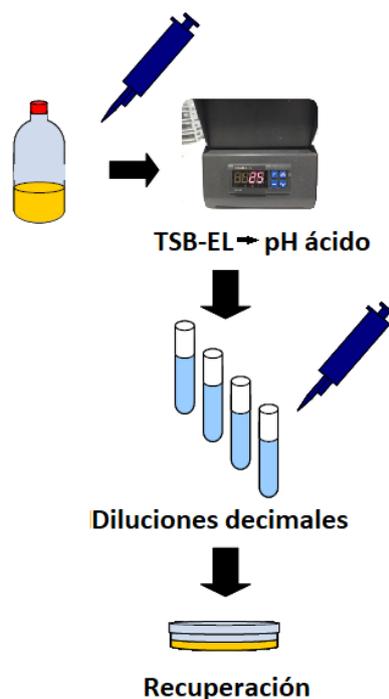


Figura 3.10. Metodología empleada para la determinación de la resistencia a la acidez.

3.4.5 Determinaciones de resistencia a otros tratamientos

Resistencia al peróxido de hidrógeno

El tratamiento se realizó, al igual que en el estudio de la resistencia a la acidez, en un equipo termostático (Incubador FX) para mantener en todo momento la temperatura constante (25°C) que se midió además con una sonda termopar. En tubos previamente esterilizados con 1 mL de tampón PBS, se inoculó la suspensión microbiana (10^8 células/mL), previamente centrifugada y resuspendida en PBS, y a continuación se añadió el peróxido de hidrógeno (Sigma Aldrich) a una concentración de entre 10 mM y 50 mM según el experimento a realizar. Tras diferentes tiempos de tratamiento las muestras fueron extraídas, se neutralizaron con MRD con 1 % de tiosulfato de sodio (Cho y col., 2010) y analizadas posteriormente.

Resistencia a la plumbagina

El tratamiento se realizó a temperatura constante (25°C) en un equipo termostático (Incubador FX). En tubos de 1 mL previamente esterilizados se inoculó la suspensión microbiana (10^8 células/mL) previamente centrifugada y resuspendida en PBS, y se añadió la plumbagina (5,3 mM) (Sigma Aldrich). Tras 30 minutos de tratamiento las muestras fueron extraídas, centrifugadas y resuspendidas en PBS para su posterior análisis.

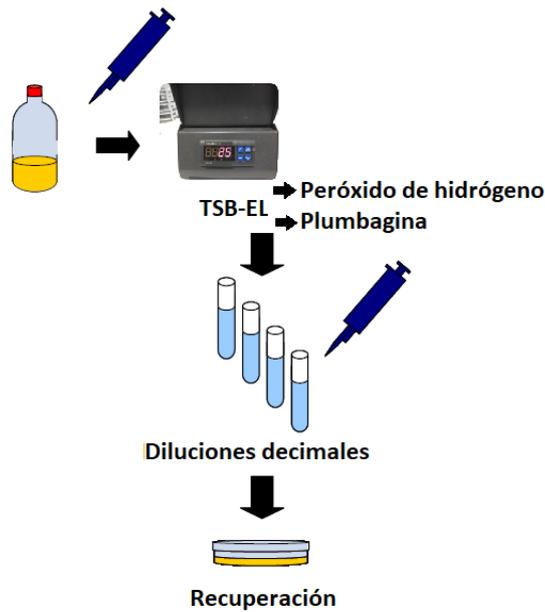


Figura 3.11. Metodología empleada para la determinación de la resistencia al peróxido de hidrógeno y a la plumbagina.

3.5 INCUBACIÓN Y RECuento DE SUPERVIVIENTES

En la mayoría de las determinaciones de resistencia el recuento de supervivientes se realizó en TSAEL, en el caso de *E. coli* y *S. senftenberg*, y en MRS agar, en el caso de *L. plantarum*. Las placas se incubaron en una estufa estática a 37°C durante un tiempo de entre 24 y 48 horas, hasta que el número de colonias se mantenía constante. En el caso de *Bacillus subtilis* el recuento de supervivientes se realizó en AN y las placas se incubaron a 37°C.

El recuento de supervivientes se efectuó con un contador automático de colonias diseñado por nuestro equipo y desarrollado por el Servicio de Instrumentación Científica de la Universidad de Zaragoza (Figura 3.12). El contador consta básicamente de una cámara de vídeo de alta resolución conectada a un ordenador y un software específico para el recuento de partículas. El equipo se diseñó tomando como modelo el contador Protos (Analytical Measuring Systems, Cambridge, Reino Unido), adaptado para el recuento de placas densamente pobladas (Condón y col., 1996). El rango de recuento que se consideró apropiado en esta Tesis fue de 10 a 10.000 colonias por placa.



Figura 3.12. Izquierda: Estufa de incubación (fotografía obtenida de <http://www.jpselecta.es>). Derecha: Contador automático de colonias.

En algunos casos las condiciones de recuperación se modificaron con el objeto de estudiar determinados parámetros fisiológicos afectados durante los diferentes tratamientos. Por ello, a continuación se describe la metodología usada en algunos casos para la recuperación celular.

Recuperación en anaerobiosis

En algunos casos, cuando se indica en el texto, las placas también se incubaron a 37°C en una cámara de anaerobiosis (Macs Vac500 Microaerophilic Workstation, Don Whitley Scientific, UK), con unas condiciones de anaerobiosis de 90 % N₂, 5 % CO₂ y 5 % de H₂.



Figura 3.13. Cámara de anaerobiosis (fotografía obtenida de <http://www.dwscientific.co.uk>).

Recuperación en medios selectivos

Para detectar la presencia de células dañadas en la membrana externa se utilizó la técnica de la siembra diferencial en medio no selectivo (TSAEL) y selectivo. Para ello se usó como

medio selectivo TSAEL con sales biliares (Oxoid). La concentración de sales biliares que se añadía se ajustó a la concentración máxima no inhibitoria (CMNI) para las células nativas, o no tratadas. Para determinar la CMNI se sembraron placas de TSAEL con diversas concentraciones de sales biliares entre 0 y 2 % (p/v), con el mismo número de microorganismos y tras 48 horas de incubación, se procedió al recuento de UFC por placa.

Por otro lado, para detectar la presencia de células dañadas en la membrana citoplasmática se usó como medio selectivo TSAEL con NaCl (Panreac S.A.). Para determinar la CMNI se sembraron placas de TSAEL con concentraciones de sal entre 0 y 6 % (p/v), y se procedió de igual modo que en el caso de las sales biliares. La figura 3.14 muestra las gráficas obtenidas al representar el porcentaje de células supervivientes frente a la concentración de sales biliares y de NaCl.

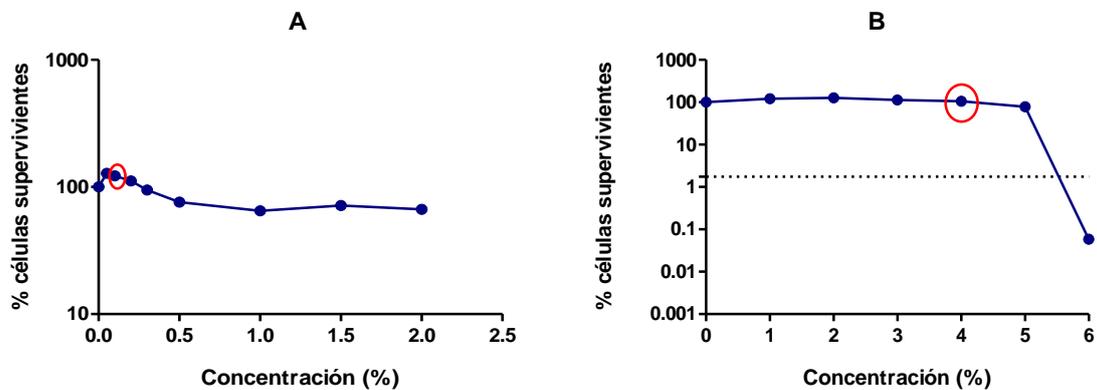


Figura 3.14. Estudio de la influencia de la concentración de sales biliares (A) y de NaCl (B) en el recuento en placa de *E. coli* BW25113.

Recuperación en medios con diferentes sustancias quelantes

En algunos casos, también se adicionó al medio de recuperación diferentes sustancias quelantes de los diferentes radicales o antioxidantes, con el fin de estudiar su efecto en la recuperación tras el tratamiento. Previamente a su utilización se determinó la CMNI de cada compuesto tal y como se detalla en el Capítulo 4.1 de la sección de Resultados y Discusión. Para ello se añadieron al TSAEL una vez esterilizado y atemperado concentraciones elegidas previamente de los diferentes compuestos, esterilizados por filtración. La suspensión en fase estacionaria de *E. coli* se diluyó en MRD y se sembraron por homogeneización en masa placas con los ágares preparados previamente, siempre con la misma cantidad de microorganismos. Las placas se incubaron a 37°C durante 24-48 h. Se procedió al recuento de UFC por placa y, se representó el porcentaje de células capaces de crecer frente a la concentración. A modo de

MATERIAL Y MÉTODOS

resumen la tabla 3.3 muestra la CMNI determinada para cada compuesto y la concentración elegida para realizar posteriores experimentos.

Tabla 3.3. Concentraciones máximas no inhibitorias y concentraciones elegidas para posteriores experimentos.

COMPUESTO	EFFECTOS DESCRITOS	CMNI	Concentración elegida
NaCl	Inhibe el crecimiento de células con membrana citoplasmática dañada	0,7 M	0,7 M
Sales biliares	Inhibe el crecimiento de células con membrana externa dañada	4,9 mM	4,9 mM
Manitol	Quelante de radical hidroxilo	NI	50 mM
Tirón	Quelante de radical superóxido	NI	20 mM
Piruvato	Quelante de peróxido de hidrógeno	9 mM	9 mM
Cisteína	Disminuye el potencial redox y reductor de hierro intracelular	30 mM	10 mM
Tiourea	Quelante de radical hidroxilo	150 mM	150 mM
Glutación	Reduce los grupos disulfuro en proteínas	30 mM	10 mM
Dipiridil	Quelante de hierro intracelular	0,5 mM	0,2 mM

NI: no inhibe el crecimiento en las condiciones experimentales estudiadas

Tras los diferentes tratamientos, y cuando lo indique el texto, los compuestos esterilizados previamente por filtración fueron añadidos al medio de recuperación.

Recuperación en medio mínimo

El medio mínimo empleado en esta Tesis ha sido el medio mínimo M9 con glucosa. Para su preparación se utilizaba agar purificado al 1,5 % hervido y esterilizado en autoclave, al que se le añadía, una vez fundido y atemperado a 45°C, una mezcla de sales (Na_2HPO_4 (6 g/L), KH_2PO_4 (3 g/L), NaCl (0,5 g/L) y NH_4Cl (1 g/L)) también esterilizadas en el autoclave, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,246 g/L), CaCl_2 (11 mg/L), glucosa (10 g/L) y FeSO_4 (10 mg/L) (Gerhardt, 1994; Stanier y Villanueva, 1996) y L-cisteína (Sigma, Madrid, España), todo ello esterilizado por filtración con filtros de 0,22 μm . La puesta a punto de este medio se detalla en el Capítulo 4.1 de esta Tesis.

En algunos casos, cuando se detalle en el texto, se midió el pH del medio con un pH-metro (pH-meter Basic 20, Crison, Barcelona, España) y el potencial redox con un medidor de pH-ORP (PH-303, Showrange, Shanghai, China).

3.6 CURVAS DE SUPERVIVENCIA

De manera general, una vez obtenidos los recuentos, se elaboraron las gráficas de supervivencia representando el logaritmo de la fracción de supervivientes (N_t/N_0) frente al tiempo de tratamiento. Posteriormente, los datos experimentales fueron representados con el programa GraphPad PRISM 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, E.E.U.U.). Cuando así se requirió, se modelizaron las curvas con la herramienta de modelo de ajuste

GlnaFIT (KU Leuven, Lovaina, Bélgica) de Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Co., Redmond, Washington, E.E.U.U.). A partir de las ecuaciones se determinaron los parámetros cinéticos de interés, que variaron en función de la cinética de inactivación. La mayoría de las curvas de supervivencia obtenidas en esta Tesis presentaban una fase de hombro y una posterior caída exponencial, por lo que se empleó el modelo de log lineal – hombro de Geeraerd (Geeraerd y col., 2000) para describir los datos experimentales. Este 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; y la tasa de inactivación (K_{max}), que se define como la pendiente de la parte lineal de la curva de supervivencia (min^{-1}). La ecuación que define este modelo es la que se presenta a continuación:

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

Donde:

- $N(t)$ (UFC/mL) representa la concentración de células en el tiempo “t”
- $N(0)$ (UFC/mL) es la concentración inicial de células
- K_{max} es la velocidad específica de inactivación (1/ unidad de tiempo)
- S_l es la duración del hombro (unidades de tiempo)
- t es el tiempo de tratamiento (unidades de tiempo)

No obstante, también se obtuvieron curvas de supervivencia que presentaban un perfil cóncavo, generalmente en el caso de los PEAV. Estas curvas se modelizaron con el mismo modelo de Geeraerd, pero adaptado para describir la presencia de fenómenos de cola (Geeraerd y col., 2000). La ecuación utilizada, también disponible en la herramienta GinaFit, es la siguiente:

$$N(t) = (N(0) - N_{res}) \cdot e^{-k_{max} \cdot t} + N_{res}$$

En este caso, el nivel de supervivientes al cual aparece la cola viene indicado por el parámetro N_{res} (ufc/mL).

También se utilizaron otras representaciones para ilustrar los datos de supervivencia, por ejemplo, gráficas de columnas representando el número de ciclos de inactivación tras distintos tiempos de tratamiento o en distintas condiciones de tratamiento, o gráficas en las que se representa el porcentaje de supervivientes en escala lineal, frente al tiempo de tratamiento.

Además, para llevar a cabo la modelización de los datos obtenidos tras el tratamiento térmico de *B. subtilis* se desarrolló un nuevo modelo matemático. Este modelo será descrito en el capítulo 4.5.

Finalmente, en algunos casos se calculó el área bajo la curva (AUC) de las gráficas de supervivencia obtenidas con los diferentes medios de recuperación y se calcularon diferentes ratios entre las AUC con el fin de analizar adecuadamente la importancia relativa de los fenómenos de reparación del daño subletal. Para ello se utilizó el software GraphPad PRISM 5.0 para obtener las AUC en cada caso.

3.7 TINCIONES, CITOMETRÍA DE FLUJO Y MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA

Para la determinación directa de daño a la membrana citoplasmática, presencia de especies reactivas del oxígeno y agregación proteica se llevaron a cabo **tinciones** con diferentes colorantes de fluorescencia o fluorocromos:

- **Yoduro de propidio** (IP, PI) (Sigma). Este colorante es impermeable, por lo que no es capaz de atravesar la membrana citoplasmática íntegra de las células. Sin embargo, cuando las células son sometidas a ciertos estreses esta membrana se ve permeabilizada, permitiendo así la entrada de este colorante al interior celular. Una vez dentro, el IP se une al ADN y al ARN emitiendo fluorescencia de color rojo. Su longitud máxima de absorción/emisión es de 535/617 nm (Johnson, 2010).

- El **H₂DCFDA** (2',7'- dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato) (Life Technologies, Carlsbad, California, E.E.U.U.) se considera un indicador general de especies oxidantes en las células, ya que reacciona con varios de los ROS y RNS, sobre todo con el peróxido de hidrógeno, los radicales hidroxilo y el peroxinitrito. Para ello difunde pasivamente en la célula donde se produce la escisión de sus grupos acetato por esterasas intracelulares y, al producirse la oxidación, emite fluorescencia de color verde brillante. Su longitud máxima de absorción/emisión es de 492-495/517-527nm (Gomes y col., 2005; Chow y col., 2011).

- **Dihidroetidio** (DHE) (Life Technologies, Carlsbad, California, E.E.U.U.) es un colorante también permeable que reacciona más específicamente con los radicales superóxido, de modo que, al oxidarse, se produce un cambio en su carga (de neutro a cargado positivamente) permitiendo así su unión con el ADN de la célula (que presenta carga negativa) y la emisión de fluorescencia de color rojo. Su longitud de onda de máxima absorción/emisión es de 535/610

nm (Gomes y col., 2005; Patsoukis y col., 2005; Esterházy y col., 2008). No obstante, no se puede descartar que se oxide con otros radicales libres, razón por la cual se considera como un indicador de especies oxidantes en general, con cierta especificidad por el superóxido, que otros colorantes no detectan (Zielonka y Kalyanaraman, 2010).

- **HPF** (hidrofenil fluoresceína) (Sigma) es un colorante fluorescente indicador de ROS derivado de la fluoresceína (fluorescencia en verde brillante, 490/515 nm). El HPF, que también es permeable, produce fluorescencia al reaccionar con el radical anión peroxinitrito o con radicales hidroxilo, sin necesidad de unirse al ADN o a otros compuestos celulares, y sin necesidad de la acción de ninguna enzima intracelular (Gomes y col., 2005; Hwang y col., 2012; Renggli y col., 2013).

- **Fluoresceína** (Sigma-Aldrich). Este fluorocromo presenta un grupo funcional isotiocianato (-N=C=S) en su estructura que permite su unión específica a proteínas, más concretamente grupos amino y sulfhidrilo. Su longitud de onda de máxima absorción/emisión es de 490/525 nm (verde brillante) (Johnson, 2010).

Para cada uno de estos colorantes se realizó un estudio previo con diferentes concentraciones y tiempos con el fin de determinar las condiciones de tinción más adecuadas. Para ello se utilizó un control negativo, es decir, células nativas que no debían presentar tinción con estos colorantes, y un control positivo, que consistía en células tratadas con calor (cuando se quería estudiar daño a la membrana citoplasmática o la agregación proteica) o con diferentes compuestos generadores de especies reactivas del oxígeno (para estudiar su formación durante los diferentes tratamientos), las cuales debían presentar tinción. Cada día de trabajo se realizó el control negativo y positivo para cada colorante a usar y, posteriormente, tras la comprobación del adecuado funcionamiento de estos colorantes se procedió a la tinción de las células objeto de estudio. La puesta a punto de esta metodología se detalla en el Capítulo 4.1, sin embargo, a modo de resumen, en la siguiente tabla se muestran las condiciones de tiempo y concentración elegidas para los diferentes colorantes, así como el control positivo y negativo que se utilizó.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 3.4. Condiciones de tinción escogidas para los colorantes empleados en posteriores experimentos y control positivo y negativo realizado previamente al experimento.

Colorante	Condiciones de tinción	Control negativo	Control positivo
Yoduro de propidio	2,9 μM / 20 minutos	Células nativas	70°C/20 min
H ₂ DCFDA	50 μM / 90 minutos	Células nativas	10 mM H ₂ O ₂ /30 min
DHE	50 μM / 90 minutos	Células nativas	5,3 mM plumbagina/30 min
HPF	50 μM / 90 minutos	Células nativas	50 mM H ₂ O ₂ /30 min
Fluoresceína	65 μM / 10 minutos	Células nativas	70°C/20 min

Para la observación y análisis de las células teñidas se utilizaron dos equipos diferentes, un citómetro de flujo y un microscopio de contraste de fases y epifluorescencia.

En primer lugar se empleó el **citómetro de flujo** Guava EasyCyte (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). Previamente a la introducción de las células en el citómetro de flujo para llevar a cabo su análisis, se teñían con diferentes colorantes según el objetivo del experimento. Una vez pasado el tiempo de incubación con el colorante, se lavaban las células, por centrifugación y resuspensión en PBS, y se introducían en el equipo de citometría de flujo. La concentración celular introducida fue de 10^5 ufc/mL, ya que en estudios previos se observó que el citómetro de flujo usado para la realización de estos experimentos detectaba de manera adecuada un rango de concentraciones entre 10^4 y 10^6 ufc/mL de nuestra cepa de *E. coli* (datos mostrados en el Capítulo 4.1). Todos los medios utilizados para la dilución de las muestras se filtraban (0,10 μm) para reducir las interferencias del medio de suspensión en el mayor grado posible.

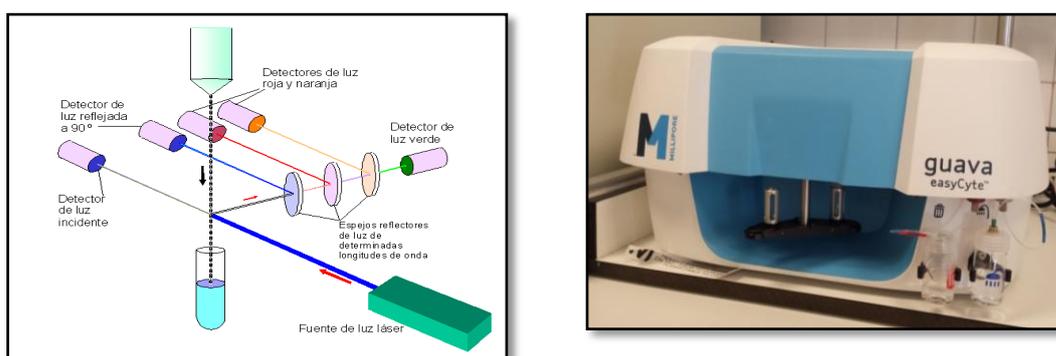


Figura 3.15. Esquema del funcionamiento y citómetro de flujo empleado para la detección de tinción.

Para la detección de las diferentes características a estudiar en las muestras objeto de estudio, los parámetros del equipo se ajustaron a los siguientes valores: velocidad de flujo (0,59 $\mu\text{L/s}$), umbral (FSC-HLog 60), ganancias (FSC-HLog 53,8; SSC-HLog 79,5; Red- HLog y

Green- HLog 29,3) y número de eventos a detectar (5000/análisis). Para evitar el ruido electrónico se ajustó el *Forward Scatter* (FSC) a 80mV. Además, para detectar la fluorescencia en rojo se utilizó un filtro de paso de banda de 695 nm y para detectar la fluorescencia en verde uno de 525 nm.

Los datos fueron procesados en el Software GuavaSoft 2.7 (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania), obteniéndose diferentes gráficas típicas. En la figura 3.16 se pueden observar diferentes formas de representar los datos tras el paso de las células por el citómetro de flujo. En el primer caso se han representado, en una gráfica de puntos, el parámetro *Forward Scatter* (FSC, hace referencia al tamaño relativo de las células) y *Side Scatter* (SSC, hace referencia a la complejidad interna y granulosidad relativa de las células), correspondiente a cada una de las células que pasan por delante del láser. En el segundo caso se describe la fluorescencia emitida por cada célula relacionándola con su tamaño (FSC). De esta manera se pueden subdividir las poblaciones según el grado de fluorescencia, y por lo tanto, dependiendo del colorante usado, el mayor o menor grado de daños a la membrana (si se tiñen con ioduro de propidio), de generación de ROS en general (si se tiñen con H₂DCFDA) o, más particularmente, de generación de radicales superóxido (si se tiñen con dihidroetidio). La tercera figura es obtenida tras la tinción con dos colorantes de manera que se puede observar si las células se han teñido con ninguno, uno o dos colorantes y, por lo tanto, se puede obtener más información. Y, en la última figura se puede observar un histograma típico, en el que se muestra el nivel de fluorescencia emitida por las células frente al número de células. En este caso, el área bajo la curva del histograma aporta una media de la fluorescencia total del conjunto de las células de la muestra analizada.

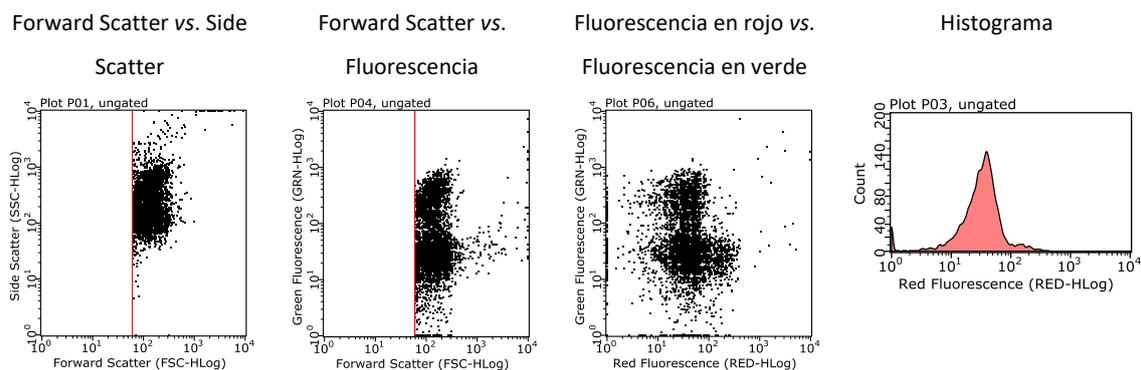


Figura 3.16. Gráficas típicas obtenidas en el citómetro de flujo.

Para la realización del análisis de estos datos se usó el mismo Software empleado para la adquisición de los mismos (GuavaSoft 2.7). Mediante este análisis se pueden obtener

MATERIAL Y MÉTODOS

diferentes parámetros a partir de dos herramientas: la creación de regiones y el análisis estadístico de los mismos.

A priori, la citometría de flujo presenta diversas ventajas frente a otras metodologías, como la microscopía de fluorescencia, ya que, por ejemplo, permite una rápida detección y cuantificación de células fluorescentes y no fluorescentes y permite un rápido análisis de un elevado número de células obteniendo de este modo datos cuantitativos de gran robustez. Sin embargo, en esta Tesis se utilizó también el microscopio de fluorescencia para la obtención de los datos de tinción celular, ya que esta metodología nos permitía una estimación más directa del porcentaje de células de *E. coli* teñidas con algunos de los colorantes utilizados (ver sección 4.1.3).

Por lo tanto, se utilizó también el **microscopio de contraste de fases y epifluorescencia** (Nikon Eclipse E400, Nikon Corporation, Japón), provisto con una cámara de alta resolución AxioCam MRc (Zeiss, Alemania), a través de la cual se captaron las imágenes en formato digital, que fueron procesadas mediante el software ZEN 2012 (Zeiss, Alemania). Las células fueron observadas con los objetivos de x40 y x100, dotados de contraste de fases, y se obtuvieron las fotografías de las células totales y células fluorescentes utilizando los distintos filtros de los que dispone el microscopio (UV-2A (EX 330-380), G-2A (EX 510-560) y B-2A (EX 450-490)). Una vez obtenidas las imágenes se procedió al recuento de las células teñidas y no teñidas con el fin de obtener los porcentajes que posteriormente fueron representados frente al tiempo de tratamiento en las gráficas. Para ello, se realizaron al menos tres fotografías representativas de diferentes campos, las cuales contenían aproximadamente entre 100 y 200 células. Al igual que para la observación mediante citometría de flujo, las muestras se teñían con diferentes colorantes según el objetivo del experimento. Una vez pasado el tiempo de incubación con el colorante, se lavaban las células, por centrifugación y resuspensión en PBS, se fijaban 2 μ L de la muestra en un portaobjetos, mediante una fina capa de agar técnico, y se cubría con un cubreobjetos. La concentración celular utilizada fue de 10^7 - 10^8 ufc/mL.

3.8 DETECCIÓN DE DAÑOS EN EL ADN: PCR Y ELECTROFORESIS

Para detectar la presencia de daño en el ADN de *E. coli* se utilizó un procedimiento adaptado de Park y Imlay (2003), quienes observaron que la presencia de daños en el ADN provoca una amplificación menos efectiva. En primer lugar se procedió a extraer el ADN de las muestras a analizar. Para ello se utilizó un kit de extracción del ADN (Realpure genomic DNA extraction kit, Real Laboratory, Valencia, España), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez extraído el ADN se cuantificó usando el espectrofotómetro Simplinano (Biochrom, Cambridge, UK) y se diluyó el ADN en agua MiliQ hasta alcanzar 10 ng/ μ l en todas las muestras. El ADN se guardó a -20°C hasta su análisis.

Tras extraer el ADN, se realizó una PCR de todas las muestras. Para ello se amplificó un fragmento de ADN de 1860 pares de bases, en este caso conteniendo el gen *rpoS*. En la tabla 3.5 se muestran los cebadores diseñados para esta amplificación.

Tabla 3.5. Cebadores o primers diseñados para la amplificación del fragmento de ADN objeto de estudio.

<i>FORWARD PRIMER</i>	5'- ACTGTCAGCAGTACATCAACCAGTA
<i>REVERSE PRIMER</i>	5'- GTTACCAGCCGCATTTATTATTTC

Tras el diseño de los cebadores se procedió a realizar la PCR. Para ello se utilizó un termociclador MultiGene II (Labnet Biotecnia, Madrid, España), y una mezcla de 20 μ L de volumen final que contenía: 20 ng del ADN extraído de las muestras, 40 μ M de cada uno de los cebadores, 20 mM de una mezcla de deoxinucleótidos (Sigma), 5x tampón para enzima de alta fidelidad (Phusion HF Buffer) y 1 μ L de enzima polimerasa de alta fidelidad (Phusion DNA Polymerase 2 U/ μ l, Thermo Scientific, Massachusetts, E.E.U.U.). Las condiciones de amplificación del ADN genómico se muestran en la tabla 3.6.

Tabla 3.6. Condiciones empleadas en la PCR para llevar a cabo la amplificación del fragmento de ADN.

	FASE	CONDICIONES
	Desnaturalización	3 minutos / 98°C
30 ciclos	Desnaturalización	10 minutos / 98°C
	Alineamiento	30 segundos / 66°C
	Elongación	90 segundos / 72°C
	Extensión final	10 minutos / 72°C

Finalmente, los productos de la PCR fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 % que se tiñó con SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad, California, E.E.U.U.). Las fotografías fueron obtenidas mediante una cámara Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, E.E.U.U.).

3.9 CONSTRUCCIÓN DE CEPAS MUTANTES

En algunos experimentos se utilizaron cepas mutantes de *E. coli* MG1655 capaces de modificar la síntesis intracelular de glutatión. Su construcción se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad Católica de Lovaina, bajo la supervisión de E. Gayán y A. Aertsen. En primer lugar se diseñó una cepa mutante de *E. coli* MG1655 deletérea en el gen *gshA*, que codifica la γ -glutamato-cisteína ligasa (necesaria para la síntesis de glutatión). El procedimiento usado para la eliminación de este gen fue descrito por Datsenko y Wanner (2000) (Figura 3.18).

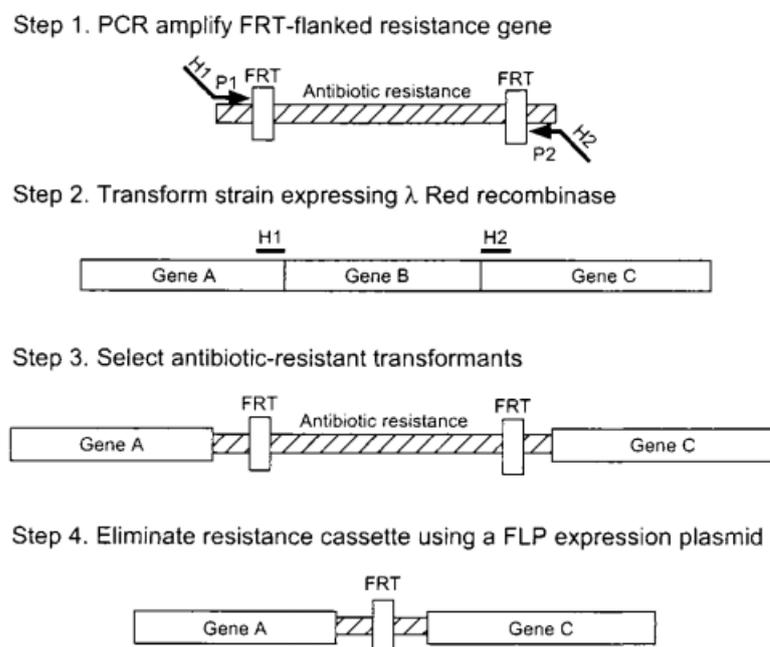


Figura 3.18. Esquema del procedimiento empleado para la eliminación del gen *gshA*. H1 y H2 se refieren a la región homóloga del gen y P1 y P2 a los sitios del cebador (Datsenko y Wanner, 2000).

Lo primero que fue necesario realizar para eliminar el gen *gshA* fue el diseño de los cebadores. En la siguiente tabla (Tabla 3.7) se especifican los cebadores diseñados. En segundo lugar, se utilizó el plásmido pKD13 que contenía el fragmento con el gen de resistencia a la kanamicina que iba a sustituir al gen a eliminar. Para poder obtener este fragmento fue necesario hacer una PCR con los cebadores previamente diseñados (*gshA*_pKD 13_ FW y RV) y la enzima de alta fidelidad (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, Thermo Scientific). Una vez terminada la PCR se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1 % para comprobar que el gen de resistencia a la kanamicina había sido obtenido correctamente.

Tabla 3.7. Cebadores diseñados para la eliminación del gen *gshA* de *E. coli* MG1655.

NOMBRE	DESCRIPCIÓN
<i>gshA</i> _pKD13_FW	ATTACAGTTATGCTAATTAACGATTTTGACAGGCGGGAGGTCAATTTGATT CCGGGGATCCGTCGACC
<i>gshA</i> _pKD13_RV	CCACTCACGAGTGGCCTTTTCTTTCTGTCAGGCGTGTTCAGCCATGTA GGCTGGAGCTGCTTCG
<i>gshA</i> _control_FW	GGCACTAATTGTAGGCCTGC
<i>gshA</i> _control_RV	CCCAGGCGAGTCTGAGTATA

Una vez obtenido el gen de resistencia a la kanamicina se procedió a realizar una recombinación para eliminar el gen deseado (*gshA*) e introducir en su lugar el fragmento del gen de resistencia a la kanamicina purificado previamente. Para ello, a partir de un cultivo en fase exponencial (37°C / 3 horas), se realizó un lavado de las células en agua miliQ, se añadió 5 µL del fragmento del gen de resistencia a la kanamicina, se llevó a cabo la electroporación celular aplicando un pulso de 5 ms y se incubaron las células en 1 mL de LB a 37°C durante 2 horas. Posteriormente, se sembraron las células en LB agar con kanamicina y las placas se incubaron a 37°C durante 24h. Tras la recombinación se comprobó mediante PCR que la eliminación del gen *gshA* se había realizado correctamente, y que en su lugar se encontraba el fragmento del gen de resistencia a la kanamicina.

Por último, se procedió a eliminar el fragmento del gen de resistencia a la kanamicina con el fin de obtener finalmente la cepa mutante deseada. Para ello fue necesario introducir el plásmido pCP20, con un gen de resistencia a la ampicilina, que presenta una FLP recombinasa encargada de eliminar el fragmento del gen de resistencia a la kanamicina (Figura 3.19), en el cultivo de *E. coli* MG1655::km Δ *gshA* mediante electroporación (un pulso de 5 ms) e incubar las células obtenidas a 30°C /24 h en LB con ampicilina. Una vez crecidas las colonias se sembraron entre 6 y 8 colonias en LB y se crecieron a 37°C / 24h, de manera que se eliminó el plásmido pCP20 debido a que es termosensible. Finalmente, se hizo una PCR de 3 o 4 colonias con el fin de comprobar, comparando con la cepa parental, que se había eliminado el gen. Para ello se usaron los cebadores previamente diseñados: *gshA*_control_FW y RV y la enzima TAQ polimerasa. Además, se mandaron las muestras a secuenciar para comprobar que se había obtenido una proteína sin sentido al eliminar el gen deseado. La cepa se guardó en criovial a -80°C para su posterior uso.

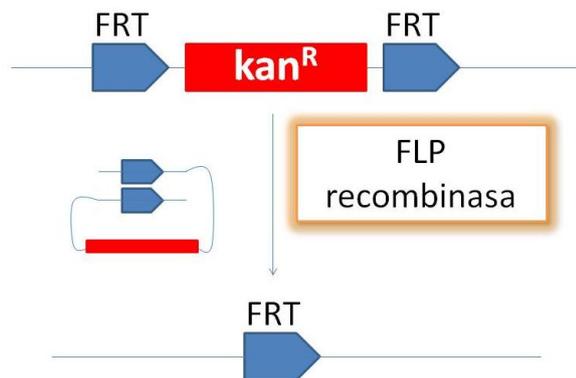


Figura 3.19. Escisión del marcador de resistencia a la kanamicina presente en el genoma bacteriano mediante FLP recombinasa, enzima contenida en un plásmido de expresión (pCP20) (Chueca, 2016).

Además de la cepa deletérea en el gen *gshA* se diseñó una cepa que sobreexpresaba el gen *gshF*, encargado de la síntesis del glutatión, ya que codifica un enzima que realiza las dos reacciones consecutivas para la síntesis del glutatión y, además, no se ve inhibida por una elevada concentración de glutatión intracelular, a diferencia de lo que ocurre con los genes *gshA* y *gshB*. Esta característica es de gran importancia cuando se quiere conseguir una elevada síntesis de glutatión por parte de la célula (Wang y col., 2016a; Zhang y col., 2016). Para su diseño, al igual que en el caso anterior, en primer lugar se procedió al diseño de los cebadores (Tabla 3.8).

Tabla 3.8. Cebadores diseñados para la introducción del gen *gshF* en *E. coli* MG1655.

NOMBRE	DESCRIPCIÓN
<i>gshF</i> _LM_FW	ATTAACGCGGTAATCTCCCC
<i>gshF</i> _LM_RV	ATGGAACCGGCGATTATTCG
<i>gshF</i> _mid_FW	GCGCTTCGTGATGGAATTC

Una vez diseñados los cebadores se procedió a la obtención del fragmento de ADN que contenía el gen *gshF*. Este gen se obtuvo de *Listeria monocytogenes* ScottA, disponible en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Católica de Lovaina (KU Leuven). Para ello fue necesario primero fosforilar los cebadores, para poder insertar posteriormente el fragmento en el plásmido pACYC184 con el método “blunt end ligation”. Tras la fosforilación de los cebadores se realizó una PCR con la enzima de alta fidelidad (Phusion High Fidelity enzyme, Thermo Scientific) y los cebadores *gshF*_LM_FW y RV fosforilados. Una vez terminada la PCR se corrió una electroforesis en gel de agarosa para comprobar que el gen *gshF* había sido obtenido correctamente.

Una vez que se obtuvo el plásmido pACYC184 con el gen *gshF* se procedió a introducir el plásmido pACYC184 en la cepa deseada (*E. coli* MG1655) mediante electroporación. Por último, se seleccionaron los transformantes mediante siembra en agar con cloranfenicol, se realizó una PCR y se mandaron a secuenciar las muestras para comprobar que la secuencia que se había introducido correspondía con la del gen *gshF*. En este caso fue necesario realizar dos PCR, una con los cebadores *gshF*_LM_FW y *gshF*_mid_FW y otra con los cebadores *gshF*_mid_FW y *gshF*_LM_RV, ya que cada pareja de cebadores permite secuenciar correctamente alrededor de 700 pb y nuestra secuencia superaba las 1000 pb. La cepa se guardó en criovial a -80°C para su posterior uso.

3.10 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL SOLUBLE INTRACELULAR

Para la determinación de la concentración de proteína total soluble intracitoplasmática se utilizó el método BCA, mediante el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific). Las células fueron lisadas por fricción con perlas de vidrio de 0,1 mm de diámetro (BioSpec Products, Bartlesville, Oklahoma, E.E.U.U.) mediante agitación en un agitador de bolas (3110BX Mini-Bead Beater, BioSpec Products). Se realizaron 5 ciclos de agitación de 10 segundos y se enfriaron las muestras en hielo entre ciclo y ciclo con el fin de evitar la desnaturalización proteica por calor. Una vez lisadas las células y centrifugadas (5 minutos, 10.000 rpm) se recogió el sobrenadante para su posterior análisis.



Figura 3.20. Bead-Beater (izquierda) y Kit Pierce BCA Protein Assay (derecha).

MATERIAL Y MÉTODOS

Una vez obtenido el sobrenadante se procedió a la determinación de la concentración de proteína total soluble de las muestras. Para ello se siguieron las especificaciones del fabricante. De manera resumida, en placas de 96 pocillos (placas "microtiter") se inoculó 25 μ L del sobrenadante de cada muestra y 200 μ L del reactivo en cada pocillo. Cada muestra se determinó por triplicado en tres pocillos diferentes. Las placas se incubaron a 37°C durante 30 minutos y se midió la absorbancia a 535 nm en un espectrofotómetro-fluorímetro modelo Tecan Genios (Tecan Ltd, Seestrasse, Suiza).

Para calcular la concentración de proteína total soluble se realizó una curva patrón con concentraciones conocidas de proteína albúmina sérica (0,01-2,00 mg/mL) y a partir de la ecuación obtenida de la misma se determinó la concentración de cada muestra, siempre dentro del rango estudiado.

3.11 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS SUPERÓXIDO DISMUTASA Y β -GALACTOSIDASA

Para llevar a cabo la determinación de la actividad de estas enzimas fue necesario lisar las células previamente, según se describe en el apartado anterior. Una vez lisadas las células y centrifugadas (5 minutos, 10.000 rpm) se recogió el sobrenadante para su posterior análisis.

Determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa

Para la determinación de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa se utilizó un kit proporcionado por la empresa ScienCell (Superoxide Dismutase (SOD) Assay, ScienCell, Carlsbad, California, E.E.U.U.). Este kit se basa en la detección del compuesto WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate sodium salt), el cual es reducido por los aniones superóxido y medido por absorbancia a 438 nm. Los radicales superóxido son generados mediante el sistema xantina-xantina oxidasa. Por ello, cuanto mayor absorbancia, mayor es la concentración de aniones superóxido y, por lo tanto, menor es la actividad de la enzima superóxido dismutasa en la muestra, encargada de eliminar estos radicales.

Siguiendo las instrucciones del fabricante, para llevar a cabo la determinación se añadió en micro cubetas (UV-Cuvette micro, Brand, Wertheim, Alemania) las cantidades especificadas de cada reactivo (250 μ L de tampón específico para la reacción, 50 μ L de xantina, 50 μ L de EDTA, 50 μ L de WST-1 y 50 μ L de la muestra a estudiar) y se comenzó la reacción añadiendo finalmente 50 μ L de la solución XOD (xantina oxidasa). A partir de ese momento se midió la

absorbancia a 438 nm en un espectrofotómetro (Libra S12, Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido) cada 5 minutos durante 20 minutos.

Al igual que en la determinación de la concentración de proteína, se realizó una curva patrón con concentraciones conocidas de SOD (40-0,625 U/mL). Para ello, se construyó una gráfica en la que se representó el % de inhibición, el cual se refiere a la capacidad de la enzima para inhibir la reacción entre los radicales superóxido y el compuesto WST-1, frente al logaritmo de la concentración de la enzima (SOD). Para calcular el porcentaje de inhibición se utilizó la fórmula facilitada por el fabricante.

$$\% \text{ inhibición} = \frac{[(\Delta Abs_{438 \text{ nm}/\text{min}})_{\text{Blanco}} - (\Delta Abs_{438 \text{ nm}/\text{min}})_{\text{Standard}}]}{(\Delta Abs_{438 \text{ nm}/\text{min}})_{\text{Blanco}}} \times 100$$

Donde el *Blanco* consistía en una muestra realizada con agua destilada estéril en lugar de la enzima SOD, y el *Standard* correspondía a cada una de las concentraciones elegidas para realizar la curva patrón.

A partir de la ecuación obtenida al representar la curva patrón se obtuvo la actividad enzimática (U/mL) de cada muestra estudiada.

Determinación de la actividad de la enzima β -galactosidasa

La actividad de la β -galactosidasa se estudió en *E. coli* W3110 (CECT 416), ya que el microorganismo utilizado más comúnmente en esta Tesis, *E. coli* BW25113, no producía esta enzima. En esta determinación el compuesto ONPG, cuya estructura es similar a la lactosa y cuya composición es galactosa y o-nitrofenol, es hidrolizado por la enzima β -galactosidasa dando lugar a la escisión del o-nitrofenol, de color amarillo. Por lo tanto la actividad enzimática es proporcional a la absorbancia a 405 nm.

Para llevar a cabo esta determinación, 2 mL de cultivo fueron centrifugados (1 min/ 10.000 rpm) y se concentraron en 1 mL de tampón acetato 100mM, pH 6,0. Estas células se lisaron mediante fricción mecánica con perlas de vidrio y se centrifugaron de nuevo para recoger el sobrenadante. Una vez obtenido el sobrenadante se procedió a realizar el ensayo enzimático.

En todas las determinaciones se realizó un control positivo y negativo general para comprobar que los reactivos funcionaban correctamente. Además, para cada muestra se realizó un control negativo con el fin de eliminar el posible ruido de fondo producido por el color del medio de cultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Conociendo la absorbancia de cada muestra y a partir de la siguiente ecuación se calculó la actividad enzimática de las mismas.

$$\frac{UA}{ml} = \frac{(A_{405\text{ nm muestra}} - A_{405\text{ nm control}}) \times 5}{10 \times 0,0046 \times 0,2}$$

Donde:

- 5: volumen total de ensayo
- 10: tiempo del ensayo en minutos
- 0,0046: coeficiente de extinción μ molar del o-nitrofenol a 405 nm
- 0,2: volumen de muestra añadido

3.12 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUTATIÓN

Para determinar la concentración intracelular de este compuesto, al igual que en los casos anteriores, las células se lisaron mediante fricción con perlas de vidrio, se centrifugaron y se recogió el sobrenadante con el material procedente del interior celular.

El kit usado para llevar a cabo esta determinación fue proporcionado por Sigma Aldrich (Glutathione Assay Kit, Sigma Aldrich), el cual permite medir el nivel de glutatión total (GSSG+GSH) en cada muestra estudiada. La determinación analítica se basa en la detección de grupos sulfhidrilo libres mediante reacción con el reactivo de Ellman's utilizando el enzima glutatión reductasa, en presencia de NADPH, para reciclar a glutatión (GSH) todos los dímeros (GSSG) formados. Siguiendo el protocolo de trabajo proporcionado por el fabricante, se realizó una curva patrón con las pendientes (Abs_{412}/tiempo) proporcionadas por muestras con concentraciones conocidas de glutatión (3,12-50 nm/mL).

Las muestras a analizar fueron mezcladas con ácido 5-sulfosalicílico (SSA) al 5 % para producir su desproteización, con el fin de detectar solamente glutatión y no grupos tioles de proteínas que pudiera haber en la muestra. Una vez realizado este paso, y siguiendo las indicaciones del fabricante, se añadió 10 μ L de cada muestra y 150 μ L de la solución de trabajo (tampón propio del ensayo, glutatión reductasa y DNTB (reactivo de Ellmans)) a una micro cubeta de 70 μ L (UV-Cuvette micro, Brand), se dejó incubar durante 5 minutos, se añadió 50 μ L de una solución diluida de NADPH, para comenzar la reacción, y se leyó la absorbancia a 412 nm a intervalos regulares de tiempo hasta 5 minutos.

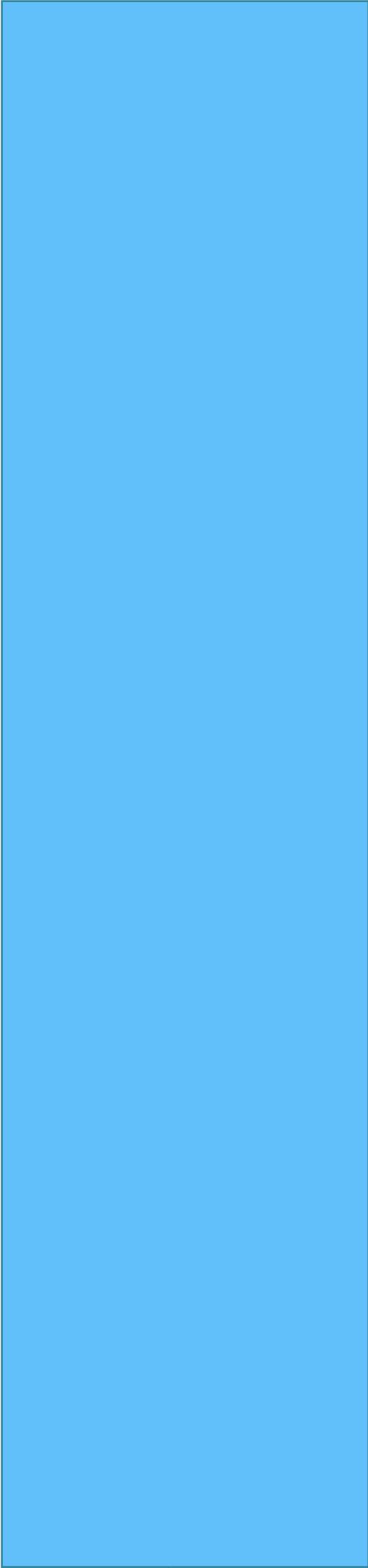
Una vez obtenidas las absorbancias se calculó la pendiente y se determinó la concentración de glutatión a partir de la ecuación obtenida en la curva patrón.

3.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

De forma general, y salvo que conste de forma explícita en el capítulo correspondiente, todas las determinaciones se realizaron al menos por triplicado, utilizando suspensiones obtenidas en diferentes días de trabajo.

Los resultados fueron sometidos a un análisis estadístico mediante el test *t* de student utilizando el programa GraphPad PRISM (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, E.E.U.U.) y las diferencias se consideraron significativas para $p \leq 0,05$. Las barras de error obtenidas corresponden a la desviación estándar de la media.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4.1 DESARROLLOS METODOLÓGICOS

4.1.1 Efecto de la adición de sustancias quelantes en el crecimiento de *E. coli* en medio sólido

La adición de diferentes sustancias quelantes y/o protectoras durante el crecimiento de *E. coli* BW25113 en agar TSAEL se estudió mediante la medida de la disminución del número de UFC por placa, y determinación de la concentración máxima no inhibitoria (CMNI), establecidas como aquellas que no inhiben más del 20 % del recuento. Las sustancias quelantes estudiadas fueron cisteína, glutatión, dipiridil, tiourea, tiron, manitol y piruvato, y el objetivo era estudiar si su adición en el medio de recuperación tras un determinado tratamiento ejercía algún efecto protector. De cada una de ellas se eligió un rango de concentraciones a estudiar, de acuerdo a lo observado por otros autores y reflejado en la bibliografía (Kari y col., 1971; Ferguson y Booth, 1998; Yang y col., 2001; Santo y col., 2008; Wang y col., 2010; Johnson y col., 2014).

Tal y como se ha indicado en el apartado 3.5 de Material y Métodos, para la determinación de la CMNI de cada compuesto en medio sólido, se sembró una concentración fija de *E. coli* BW25113 en placas con agar TSAEL conteniendo concentraciones de cada compuesto previamente elegidas según la bibliografía. Tras la incubación de las mismas se procedió al recuento de UFC por placa y se representó el porcentaje de células capaces de crecer frente a la concentración. La figura 4.1.1 muestra los resultados obtenidos para cada compuesto.

A partir de estas gráficas se determinaron las CMNI para cada compuesto. Finalmente, para los experimentos de recuperación celular, en aquellos casos en los que no había inhibición (tiron y manitol) se eligieron las concentraciones de acuerdo a la bibliografía (Santo y col., 2008; Johnson y col., 2014). En el resto de compuestos se utilizó siempre la concentración previa a la CMNI testada en este estudio, excepto en el caso del glutatión y la cisteína, en los que fue necesario reducir aún más la concentración por provocar ambos compuestos un descenso del pH del medio hasta valores que podrían resultar inhibitorios en células tratadas (glutatión: pH 2,88; cisteína: pH 1,71). A modo de resumen, en la tabla 4.1.1 se muestra las CMNI y las concentraciones elegidas finalmente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

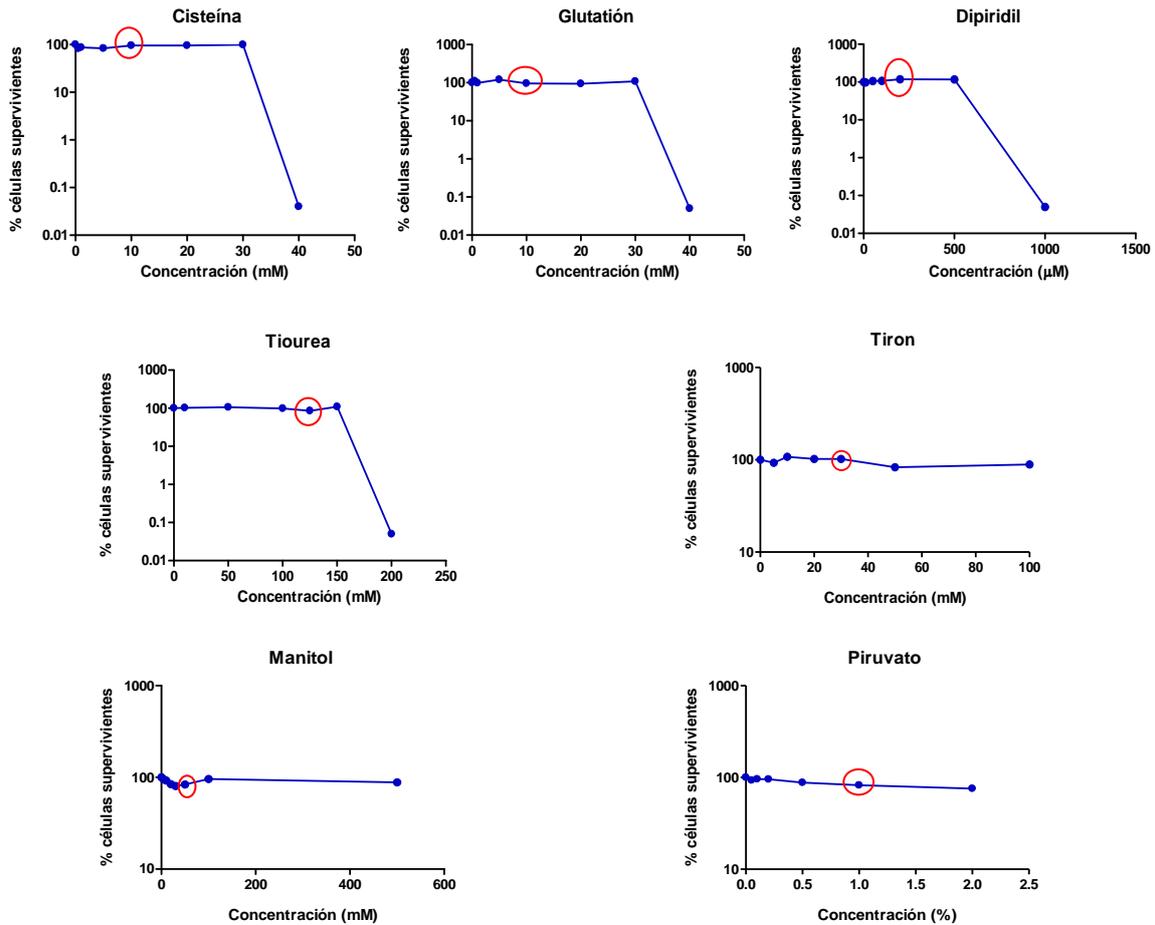


Figura 4.1.1. Determinación de las concentraciones máximas no inhibitorias para cada compuesto.

Tabla 4.1.1. Concentraciones máximas no inhibitorias y concentraciones elegidas para posteriores experimentos.

COMPUESTO	EFFECTOS DESCRITOS	CMNI	Concentración elegida
Cisteína	Disminuye el potencial redox y reductor de hierro intracelular	30 mM	10 mM
Glutatión	Reduce los grupos disulfuro en proteínas	30 mM	10 mM
Dipiridil	Quelante de hierro intracelular	0,5 mM	0,2 mM
Tiourea	Quelante de radical hidroxilo	150 mM	150 mM
Tirón	Quelante de radical superóxido	NI	20 mM
Manitol	Quelante de radical hidroxilo	NI	50 mM
Piruvato	Quelante de peróxido de hidrógeno	9 mM	9 mM

NI: no inhibe el crecimiento en las condiciones experimentales estudiadas

4.1.2 Medio mínimo M9-glucosa-cisteína

Con objeto de poder estudiar la recuperación celular tras los tratamientos en unas condiciones que supusieran un mínimo estrés oxidativo, se decidió utilizar un medio mínimo, ya que se ha demostrado que no se generan especies reactivas en el mismo durante el autoclavado y almacenamiento (Mackey y Seymour, 1987). Además, se estudió el efecto de la

adición de cisteína, como agente reductor del potencial redox, en este mismo medio, ya que en una exploración previa se observó que podía mejorar la recuperación celular tras los tratamientos con peróxido de hidrógeno, en condiciones de anaerobiosis (Marcén, 2014). Este estudio se llevó a cabo en colaboración con V. Ruiz, en el marco de un trabajo Fin de Máster (Ruiz, 2015).

Las células fueron sometidas a un tratamiento térmico a 58°C durante 0 (células nativas), 1, 2 y 3 minutos, tras el que se recuperaron en distintas condiciones. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.1.2 en la cual se incluyen también los datos obtenidos en medio complejo TSAEL.

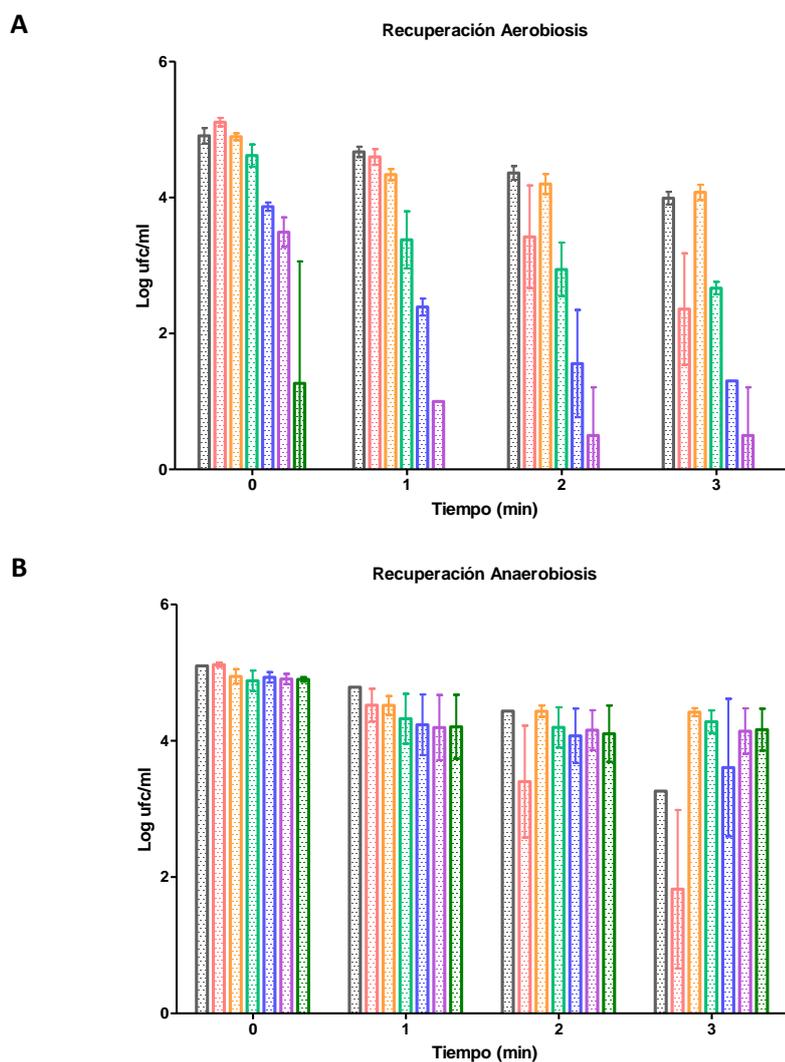


Figura 4.1.2. Recuperación en placa en agar M9-glucosa con distintas concentraciones de cisteína y en agar TSAEL en condiciones A: aerobias, B: anaerobias. (●) TSAEL, (●) 0 mM cisteína, (●) 1 mM cisteína, (●) 3 mM cisteína, (●) 5 mM cisteína, (●) 8 mM cisteína y (●) 16 mM cisteína (Ruiz, 2015).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se aprecia en la figura 4.1.2A, las células de *E. coli* tratadas por calor se recuperaban peor en medio mínimo (agar M9 sin cisteína) que en el medio complejo (TSAEL) en condiciones de aerobiosis. Ello podría deberse a la mayor disponibilidad de nutrientes esenciales en el medio complejo, que favorecerían una más rápida reparación de las diversas estructuras y funciones celulares dañadas por el tratamiento térmico. No obstante el enriquecimiento del agar M9 con 1 mM de cisteína facilitaba la reparación de los daños hasta los niveles observados en el medio complejo. Esto podría indicar que la adición de cisteína compensaba en buena parte la carencia de nutrientes esenciales. Sin embargo, un aumento en la concentración de cisteína por encima de 1 mM provocaba un empeoramiento progresivo de la recuperación, hecho que parecía indicar un efecto más complejo que la mera utilización como nutriente. La adición de cisteína a elevadas concentraciones interfería con el crecimiento incluso de las células nativas, si bien este efecto era mucho más evidente para las células que habían estado sometidas a la acción del calor.

Cuando la recuperación se llevaba a cabo en condiciones de anaerobiosis (Figura 4.1.2B), la adición de cisteína, incluso a concentraciones elevadas, de 16 mM, mejoraba la recuperación celular tras el tratamiento térmico, en comparación tanto con el medio complejo como con el mínimo no suplementado. Este efecto se puede observar claramente en las células tratadas durante 3 minutos.

Por otro lado, al comparar la recuperación en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, la observación más importante es que el efecto tóxico que la cisteína (a elevada concentración) ejercía en condiciones de aerobiosis, desaparecía en condiciones de anaerobiosis, tanto para las células nativas como para las tratadas por el calor.

Estos resultados confirman que el efecto de la cisteína depende de la atmósfera de incubación, lo que indica que seguramente está relacionado con fenómenos de control del equilibrio redox. De hecho, el posible efecto tóxico de la cisteína bajo determinadas condiciones experimentales ha sido descrito previamente por otros autores y ha sido atribuido a su acción como promotor de la reacción de Fenton y consiguiente formación de radicales hidroxilo (Park y Imlay, 2003).

Por ello, una vez observado el efecto de la adición de cisteína en el medio mínimo M9 glucosa, se eligieron las condiciones de recuperación en anaerobiosis en medio mínimo M9 glucosa suplementado con 3 mM de cisteína, como medio óptimo para la recuperación de células, presumiblemente a través de un mecanismo de reducción del estrés oxidativo post-tratamiento. Este medio presentó un valor de pH cercano a la neutralidad (pH 6,78) y un potencial redox muy inferior al presentado por el medio sin adición de cisteína (-501 mV). Se eligió esta concentración de cisteína, ya que era la concentración más alta que permitía una

buena recuperación celular, tal como se puede observar en la figura 4.1.2B, ya que concentraciones superiores (5, 8 y 16 mM) ya no mostraban tan marcadamente este efecto protector.

4.1.3 Puesta a punto de las técnicas de tinción con fluorocromos

Previamente a la elección de las condiciones de concentración/tiempo de tinción usadas para cada fluorocromo utilizado en esta Tesis, se determinaron las concentraciones de peróxido y plumbagina necesarias para obtener los controles positivos para cada colorante. Para ello, se realizó un estudio previo de la resistencia de *E. coli* BW25113 frente a estos compuestos. A continuación se muestran los resultados obtenidos.

Peróxido de hidrógeno

En primer lugar se procedió a determinar la resistencia del microorganismo modelo *Escherichia coli* BW25113 frente al peróxido de hidrógeno. Con objeto de minimizar en la medida de lo posible la variabilidad en los resultados, se decidió realizar los experimentos bajo condiciones muy estandarizadas, de manera que se trabajó con una concentración celular inicial fija (10^6 ufc/mL), concentraciones de peróxido de hidrógeno de 10, 20 y 50 mM en un medio de tratamiento inorgánico (PBS), se termostataron los tubos con el medio de tratamiento a 25°C, y se siguió el mismo protocolo de neutralización (tiosulfato al 1 % en PBS), dilución (MRD), siembra e incubación (TSAEL, 37°C, aerobiosis). La figura 4.1.3 muestra las gráficas de supervivencia de *E. coli* a las diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno.

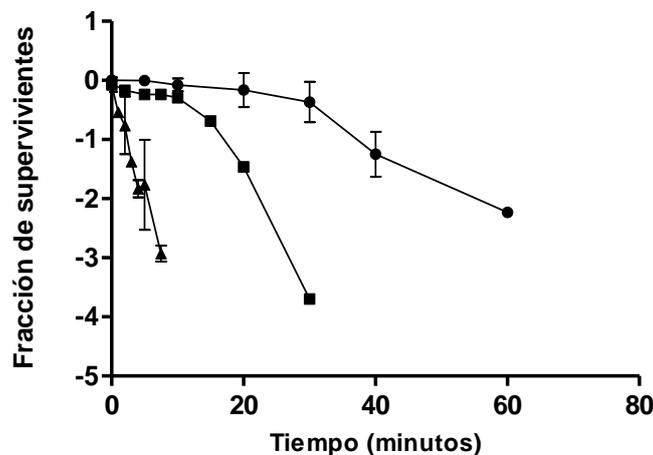


Figura 4.1.3. Gráfica de supervivencia de *E. coli* BW25113 frente a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno: 10 mM (●), 20 mM (■) y 50 mM (▲).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La puesta a punto de esta metodología se desarrolló con el fin de poder utilizarla posteriormente para el estudio de la formación de especies reactivas del oxígeno. El peróxido de hidrógeno, como ya se ha indicado en la introducción, no es considerado un radical libre como tal, pero se incluye dentro del grupo de las especies reactivas del oxígeno debido a que es químicamente más activo que el oxígeno molecular. Por ello, a partir de los datos obtenidos anteriormente se eligieron las concentraciones de peróxido utilizadas posteriormente. A modo de resumen, la tabla 4.1.2, muestra las concentraciones elegidas, el microorganismo sobre el cual se va a aplicar ese tratamiento y la utilización de cada una de ellas.

Tabla 4.1.2. Condiciones de concentración/tiempo de exposición al peróxido de hidrógeno elegidas para posteriores tratamientos.

Concentración/tiempo	Microorganismo	Utilización
10 mM/30 min	<i>E. coli</i> BW25113	Control positivo de la tinción con H ₂ DCFDA
50 mM/30 min	<i>E. coli</i> BW25113	Control positivo de la tinción con HPF

Plumbagina

Como en el caso del peróxido de hidrógeno, la determinación de la resistencia de *E. coli* se llevó a cabo con el fin de encontrar unas condiciones adecuadas para el estudio posterior de la formación de especies reactivas del oxígeno, ya que la plumbagina es conocida por su capacidad para producir radicales superóxido en el interior celular. Por ello, su utilización posterior consistirá en la generación de radicales superóxido en aquellas células control positivo para la tinción con dihidroetidio (DHE).

Para determinar la concentración de plumbagina a utilizar en posteriores experimentos se realizó una búsqueda bibliográfica y se partió de las condiciones descritas por Farr y Kogoma (1991) para *E. coli* (2 mM / 2 h). Se procedió a optimizar dichas condiciones con el fin de reducir el tiempo de tratamiento. Finalmente se eligieron unas condiciones en las que, alcanzando un grado de inactivación similar al obtenido por estos autores (1,5 ciclos Log, aproximadamente), se utilizó una concentración superior de plumbagina y un menor tiempo de exposición de las células a este compuesto. Las condiciones elegidas finalmente para el tratamiento de *E. coli* con plumbagina fueron de 5,3 mM / 30 minutos.

Una vez determinadas las condiciones de tratamiento con peróxido de hidrógeno y plumbagina para obtener los controles positivos para cada colorante, se procedió a estudiar

qué concentración celular era necesaria para detectar las células en cada una de las dos técnicas utilizadas, citometría de flujo y microscopía de epifluorescencia.

En el caso del citómetro de flujo se estudiaron concentraciones microbianas desde 10^3 ufc/mL hasta 10^8 ufc/mL. Para ello se analizaron a través del citómetro diferentes concentraciones celulares que, además, se sembraron en placa (TSAEL) para confirmar el número real de células. A partir de los datos recogidos se obtuvo la figura 4.1.4, en la que se representó el número de células por mililitro determinado mediante recuento en placa y el número de células por mililitro determinado mediante citometría de flujo. La línea roja muestra la recta de equivalencia teórica entre ambas determinaciones. La gráfica muestra que cuando se utilizaban concentraciones celulares por debajo de 10^4 ufc/mL y por encima de 10^6 ufc/mL, el recuento ofrecido por el citómetro era superior o inferior al real, respectivamente. Por ello, se eligió una concentración celular de 10^5 ufc/mL para posteriores experimentos.

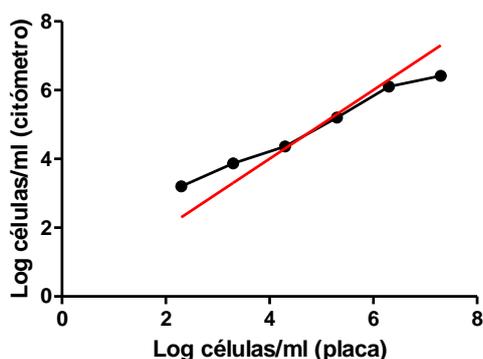


Figura 4.1.4. Determinación de la concentración celular adecuada para el análisis celular mediante citometría de flujo.

En el caso del microscopio, se prepararon diluciones comprendidas entre 10^5 ufc/mL y 10^9 ufc/mL y se observaron al microscopio. Concentraciones por debajo de 10^7 ufc/mL se detectaban con mucha dificultad con esta técnica. Por ello, dado que la concentración de 10^8 ufc/mL presentaba un número de células por campo suficientemente elevado para permitir su detección y su recuento se eligió esta concentración para posteriores experimentos.

Una vez determinada la concentración necesaria para el análisis microbiano mediante citometría y microscopía de fluorescencia se procedió a determinar la concentración y tiempo de tinción necesario para cada fluorocromo.

Cabe destacar que las células tuvieron que ser teñidas tras diluirlas hasta la concentración deseada (Figura 4.1.5A), ya que si se teñían las células a una concentración superior a la

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

necesaria para el posterior análisis (10^8 ufc/mL en el caso del análisis mediante microscopía de contraste de fases y epifluorescencia y 10^5 ufc/mL para el análisis mediante citometría de flujo), y posteriormente se diluían, se producía una pérdida de tinción, como se puede observar en la figura 4.1.5B.

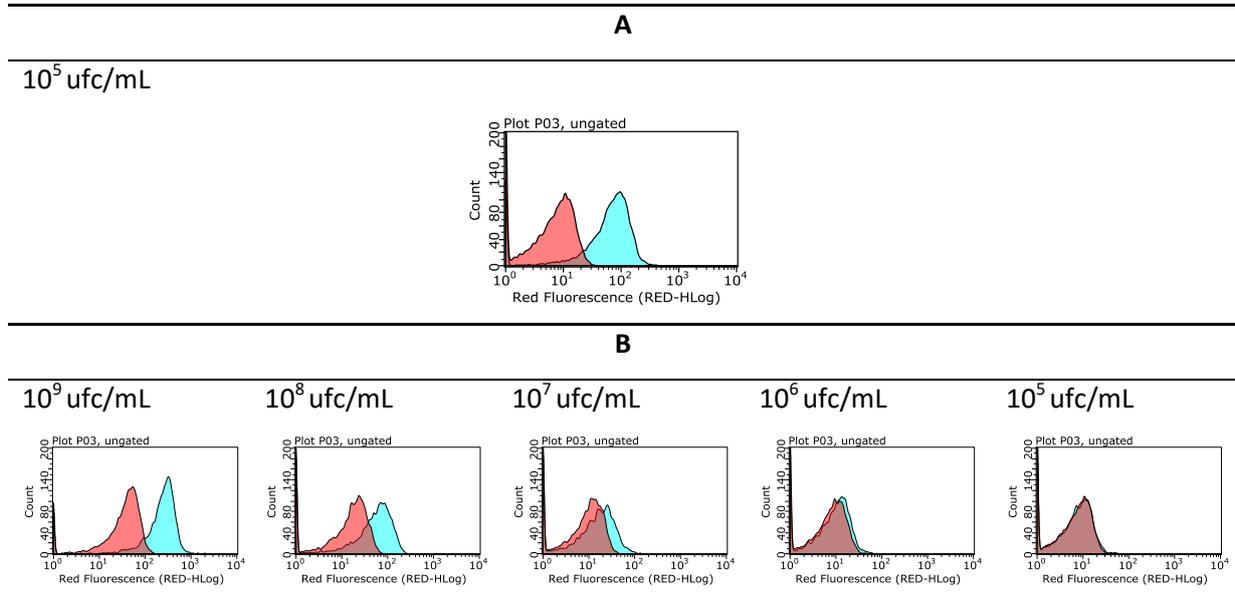


Figura 4.1.5. Pérdida de la tinción producida al diluir las células una vez teñidas con DHE (B), en comparación con la tinción emitida por las células teñidas a la concentración previamente elegida como apropiada (A).

- **Yoduro de propidio (IP).**

Tal y como se especifica en la tabla 3.4 del apartado 3.7 de Material y Métodos, se usaron células nativas como control negativo para comprobar que este colorante no tiñe células intactas, y células tratadas por calor ($70^{\circ}\text{C}/20$ minutos) como control positivo para comprobar la correcta tinción de células con la membrana citoplasmática dañada.

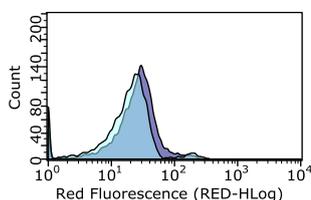
Las condiciones de tinción de partida se eligieron conforme a la bibliografía (Virto y col., 2005a; Klotz y col., 2010). Estas condiciones fueron de $2,9 \mu\text{M}$ durante 20 minutos, tras lo cual las células fueron analizadas por citometría de flujo. Inicialmente, fue necesario determinar las condiciones de tratamiento térmico más adecuadas para obtener un control positivo que se tiñese al 100 %, es decir, un control positivo en el que todas las células presentasen daños en la membrana suficientes como para permitir la entrada de este colorante.

Para ello se estudiaron diferentes temperaturas y tiempos de tratamiento térmico (Figura 4.1.6). Como se desprende de la gráfica, unas condiciones de tratamiento de $50^{\circ}\text{C} / 10$ minutos apenas producían permeabilización al IP en las células tratadas; un tratamiento a

temperaturas de 60°C sí que producía cierta permeabilización, siendo mayor al aumentar el tiempo de tratamiento; y esto mismo ocurría cuando las células eran tratadas con temperaturas de 70°C, siendo a los 20 minutos de tratamiento cuando se observaba una buena separación de los picos en los histogramas del control negativo (azul claro) y del control positivo (gris). Por ello, estas fueron las condiciones de temperatura y tiempo empleadas para el desarrollo del control positivo de IP en posteriores experimentos. Cabe reseñar que regímenes de tratamiento térmico más intenso comenzaban a producir la aparición de células teñidas con diferente intensidad de fluorescencia, probablemente debido a que provocan cambios en la conformación del ADN, y con ello cambios en la intensidad de unión a IP.

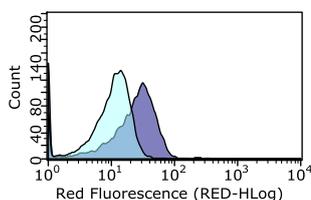
50°C

10 minutos

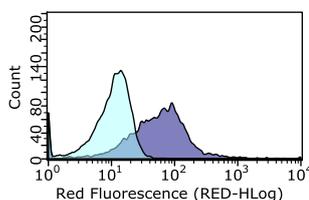


60°C

10 minutos

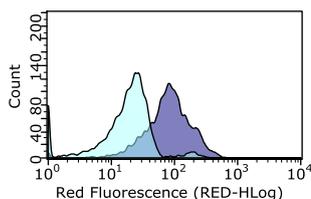


30 minutos

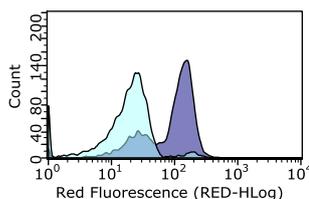


70°C

2 minutos



10 minutos



20 minutos

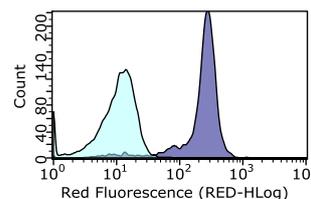


Figura 4.1.6. Estudio de las condiciones de tratamiento necesarias para la obtención del control positivo de IP cuyo histograma se separe al 100 % del histograma del control negativo.

A partir de estas condiciones, tanto de tratamiento como de tinción, se comprobó mediante microscopía por contraste de fases y epifluorescencia que las células del control negativo no presentaban tinción y que el 100 % de las células del control positivo estaban teñidas.

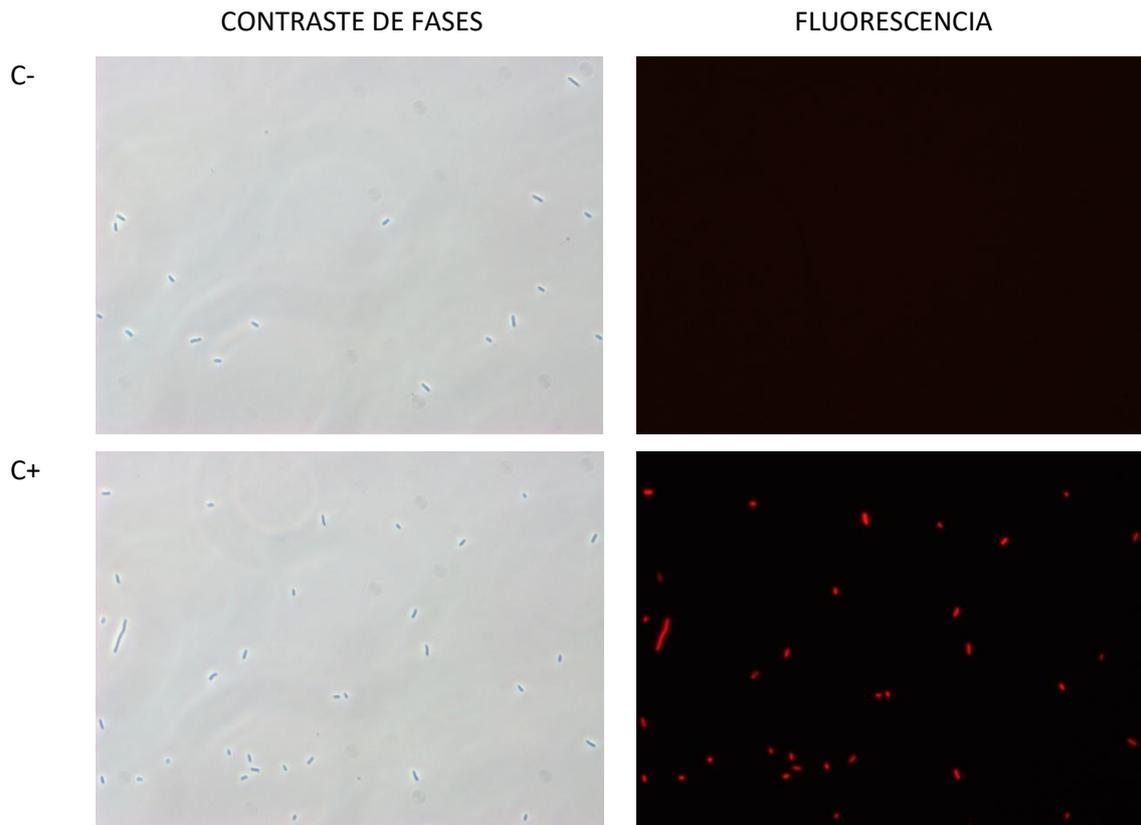


Figura 4.1.7. Fotografías obtenidas tras la observación en el microscopio de contraste de fases-epifluorescencia de los controles negativo y positivo teñidos con yoduro de propidio.

- **H₂DCFDA (2',7'- dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato).**

Para determinar las condiciones de tinción con el fluorocromo H₂DCFDA, se realizó un control negativo, con células nativas, y un control positivo, con células tratadas con peróxido de hidrógeno, utilizando las concentraciones de peróxido determinadas previamente.

En primer lugar, se estudió la concentración de colorante necesario para teñir el control positivo, pero no el negativo. El rango de concentraciones usadas estaba comprendido entre 5 y 500 μ m, de acuerdo a la bibliografía. El tiempo de tinción en todos los casos fue de 30 minutos, siempre en oscuridad.

La figura 4.1.8 muestra los histogramas superpuestos obtenidos mediante citometría de flujo de los controles negativo y positivo para cada concentración estudiada.

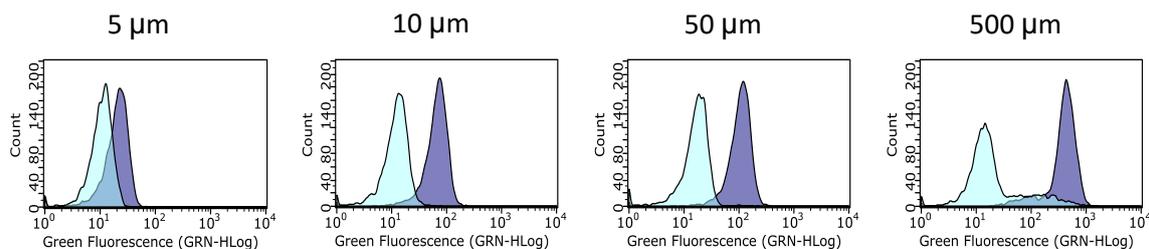


Figura 4.1.8. Estudio de la concentración de H₂DCFDA a usar para diferenciar el control negativo (pico azul claro) del control positivo (pico gris).

Los histogramas mostraron cómo el control positivo se iba desplazando hacia la derecha, es decir, presentaba una mayor fluorescencia en verde, conforme aumentaba la concentración de colorante utilizado. Sin embargo, concentraciones superiores a 50 μm teñían una pequeña proporción de las células del control negativo, por lo que estas concentraciones fueron descartadas. Tras la observación de estos resultados se escogió la concentración de 50 μm para posteriores experimentos, ya que era la concentración que permitía una buena separación de ambos picos sin observarse tinción del control negativo. El tiempo de tinción usado para obtener las gráficas de la figura 4.1.8 fue de 30 minutos, en oscuridad. Aunque se observó una buena separación, se procedió a estudiar si un tiempo inferior conseguía el mismo efecto o si un tiempo superior conseguía una mejor separación. La figura 4.1.9 muestra los resultados obtenidos tras teñir las células con 50 μm de H₂DCFDA durante diferentes tiempos.

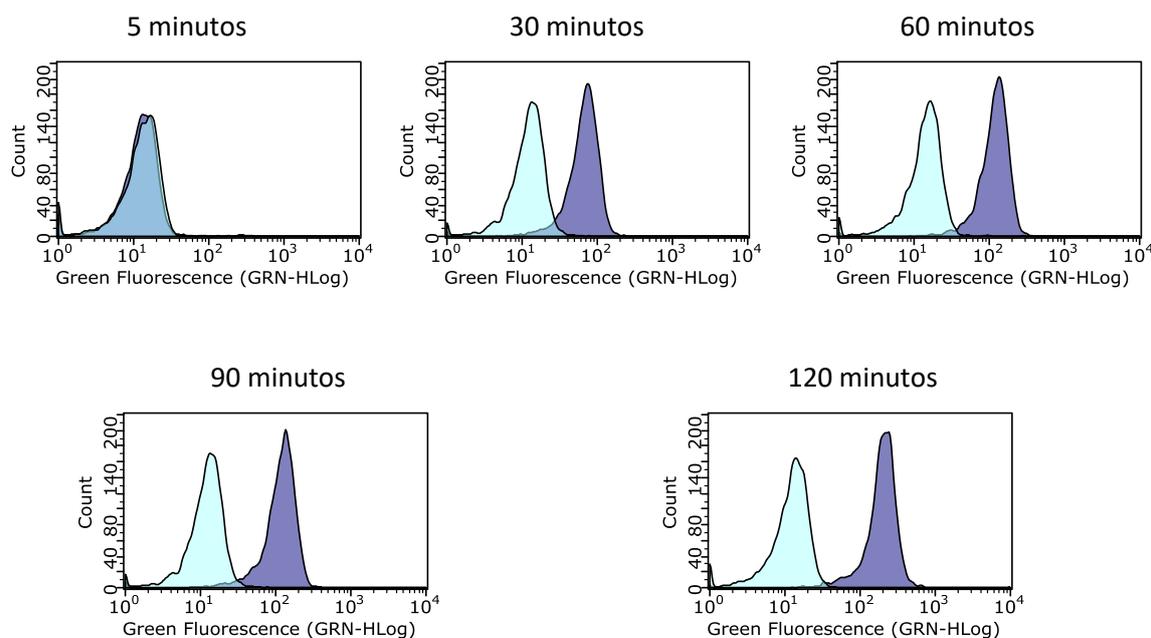


Figura 4.1.9. Estudio del tiempo de tinción necesario para obtener una buena diferenciación del control negativo (pico azul claro) y del control positivo (pico gris).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras obtener estas gráficas, dado que la separación de los picos era aún mayor tras teñir los controles con 50 μm de H_2DCFDA durante 90 minutos que cuando se teñeron durante 30 minutos, se eligieron estas condiciones como condiciones finales de tinción con este colorante. Estas condiciones difieren de las usadas por otros autores, que utilizan menos concentración de colorante y menos tiempo de tinción (Arku y col., 2011; Chow y col., 2011). Estos autores utilizaron concentraciones de alrededor de 20 μm durante 30 minutos de tinción. Observando las gráficas de la figura 4.1.8 se deduce que estas condiciones también permitirían una separación de los picos adecuada.

Por último, se comprobó que al observar en el microscopio de fluorescencia ambos controles (negativo y positivo) teñidos con estas condiciones elegidas (50 μm / 90 minutos) se observaba tinción en el control positivo, pero no en el negativo.

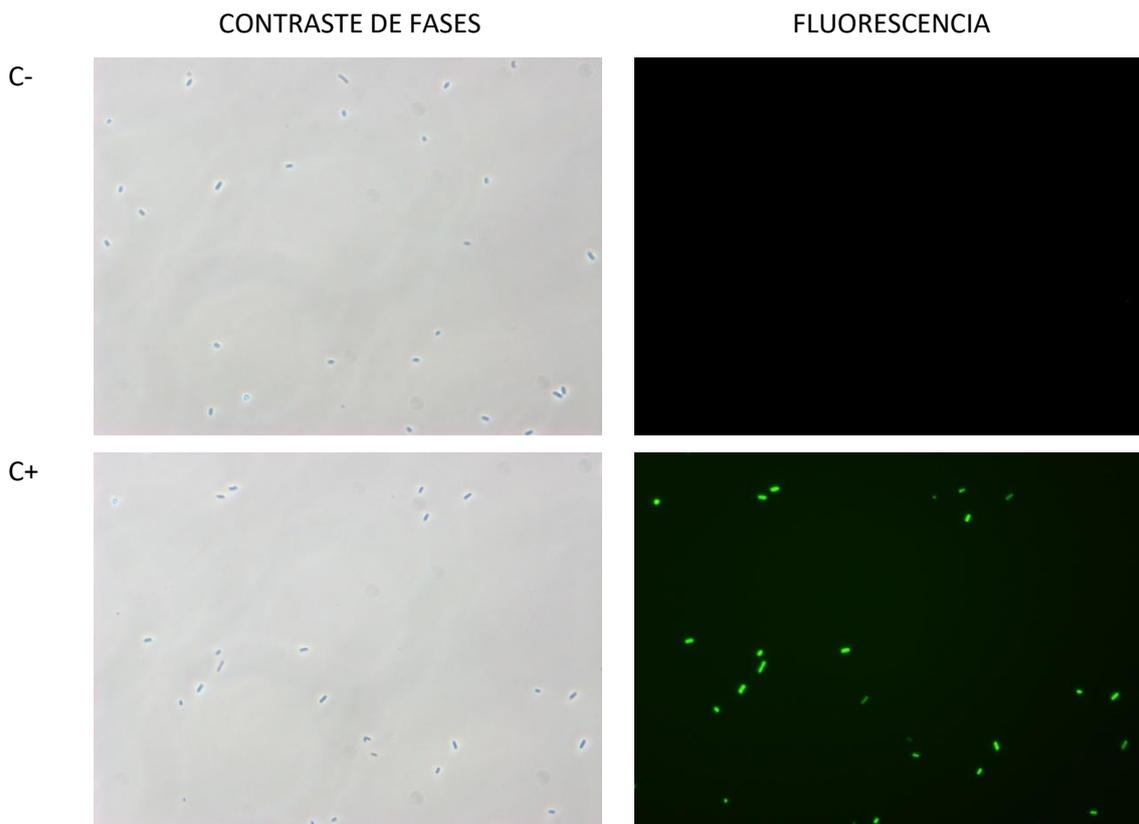


Figura 4.1.10. Fotografías obtenidas tras la observación en el microscopio de contraste de fases-epifluorescencia de los controles negativo y positivo teñidos con H_2DCFDA .

- **DHE (dihidroetidio)**

Al igual que en el caso anterior, para determinar condiciones de tinción con el fluorocromo DHE se realizó un control negativo, con células nativas, y un control positivo, con células tratadas con plumbagina, con las condiciones descritas previamente en este mismo apartado.

Una vez obtenidos ambos controles se procedió al estudio de la concentración de DHE necesaria para teñir el control positivo pero no el negativo. El rango de concentraciones usadas estaba comprendido entre 5 y 500 μm , estudiándose dos tiempos de tinción (30 y 60 minutos) en todos los casos, siempre en oscuridad. La figura 4.1.11 muestra los histogramas obtenidos tras analizar los resultados mediante citometría de flujo.

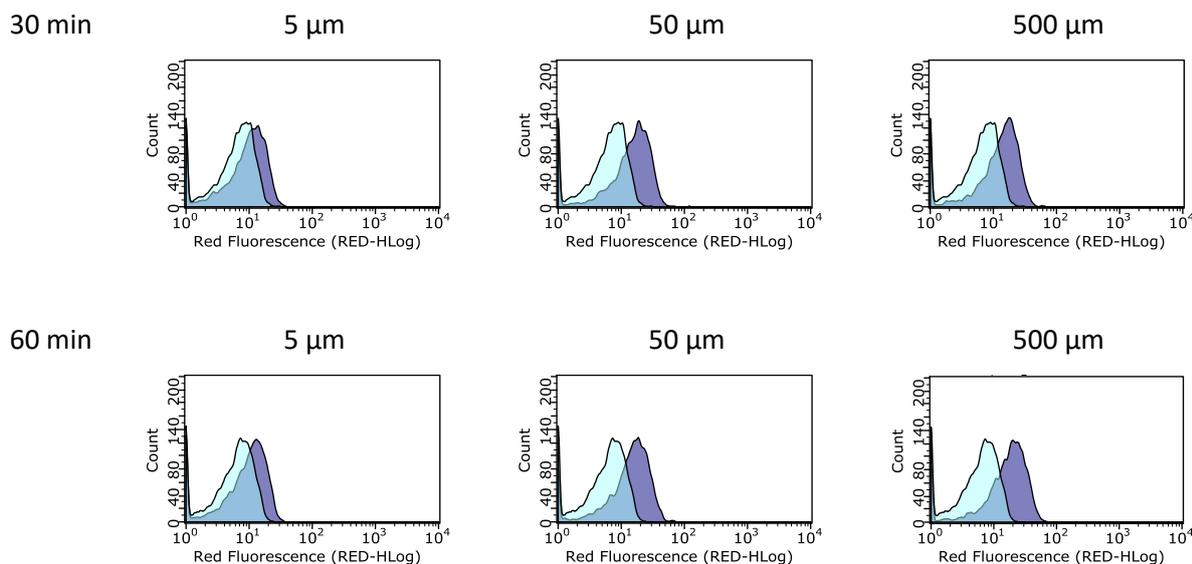


Figura 4.1.11. Estudio de la concentración de DHE a usar para diferenciar el control negativo (pico azul claro) del control positivo (pico gris).

Como se puede observar, en todos los casos los picos del control negativo y del control positivo se encuentran, en mayor o menor medida, superpuestos. Dado que aumentar la concentración de colorante no parecía mejorar esta separación se eligió una concentración de 50 μm y se estudiaron diferentes tiempos de tinción, con el fin de observar si un aumento en el tiempo de tinción podría mejorar la separación. Los tiempos estudiados estuvieron comprendidos entre 5 y 120 minutos (Figura 4.1.12).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tal y como se puede observar en las gráficas un tiempo superior a 60 minutos, como es el caso de 90 minutos, mejoraba ligeramente la separación entre los picos. Sin embargo, un mayor aumento en el tiempo de tinción, 120 minutos, no producía ninguna mejora adicional.

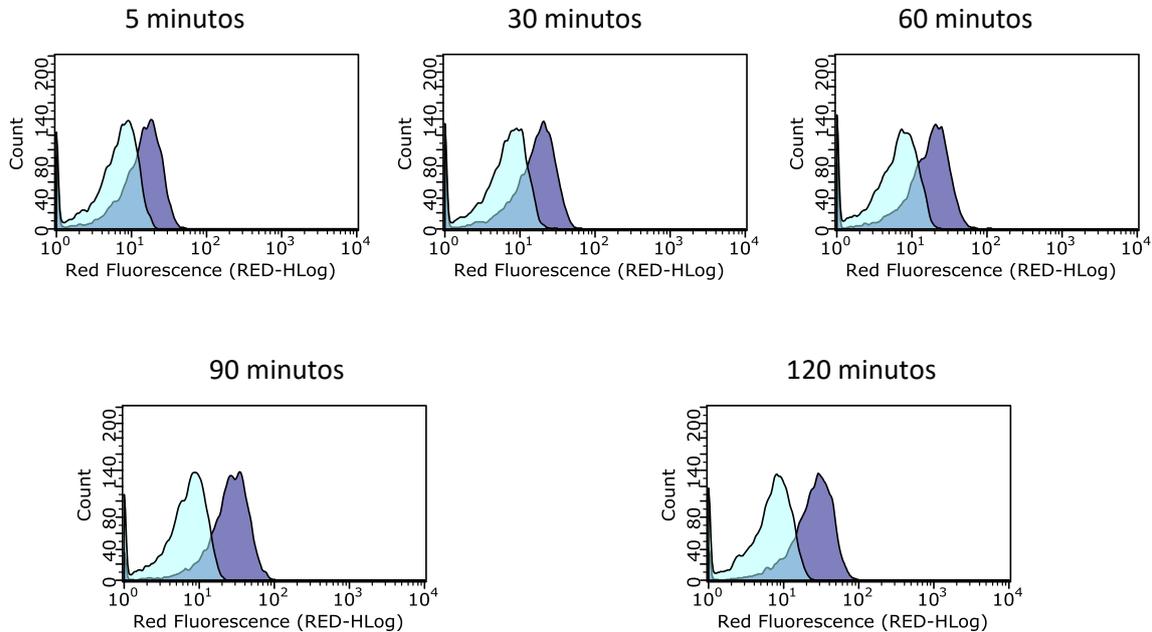


Figura 4.1.12. Estudio del tiempo de tinción necesario para obtener una buena diferenciación del control negativo (pico azul claro) y del control positivo (pico gris).

Tras obtener estas gráficas, se eligieron unas condiciones de tinción de 50 μm /90 minutos, ya que eran aquellas condiciones que permitían una mejor diferenciación de los picos del control negativo y positivo, aunque la separación nunca fue del 100 %. Estas condiciones coincidían con las descritas por otros autores (Patsoukis y col., 2005; Esterházy y col., 2008).

Como ya se ha descrito previamente, el uso del citómetro de flujo para la obtención de los datos de tinción con DHE no permitía la separación al 100% de los picos del control negativo y positivo. Además, los porcentajes obtenidos tras realizar mezclas conocidas de células nativas (sin teñir) y tratadas con plumbagina (100 % teñidas) eran menores a los esperados, a diferencia de lo que ocurría al observar las tinciones al microscopio (Figura 4.1.13), por lo que a lo largo de los experimentos llevados a cabo en esta Tesis se utilizó también el microscopio de fluorescencia para la obtención de los datos de tinción con DHE, ya que esta metodología nos permitía una mejor estimación del porcentaje de células de *E. coli* teñidas.

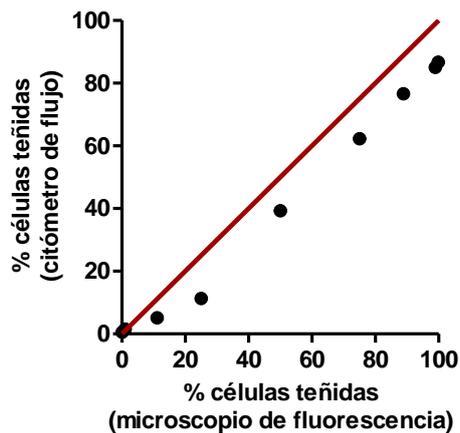


Figura 4.1.13. Comparación del porcentaje de células de *E. coli* teñidas con DHE estimadas mediante el citómetro de flujo y mediante el microscopio de fluorescencia.

Con el fin de estudiar si las condiciones de tinción elegidas permitían una buena diferenciación de ambas poblaciones mediante microscopía de contraste de fases y epifluorescencia, se observaron ambos controles (negativo y positivo) teñidos con DHE (50 μ m/ 90 minutos). Las fotografías obtenidas se muestran a continuación (Figura 4.1.14).

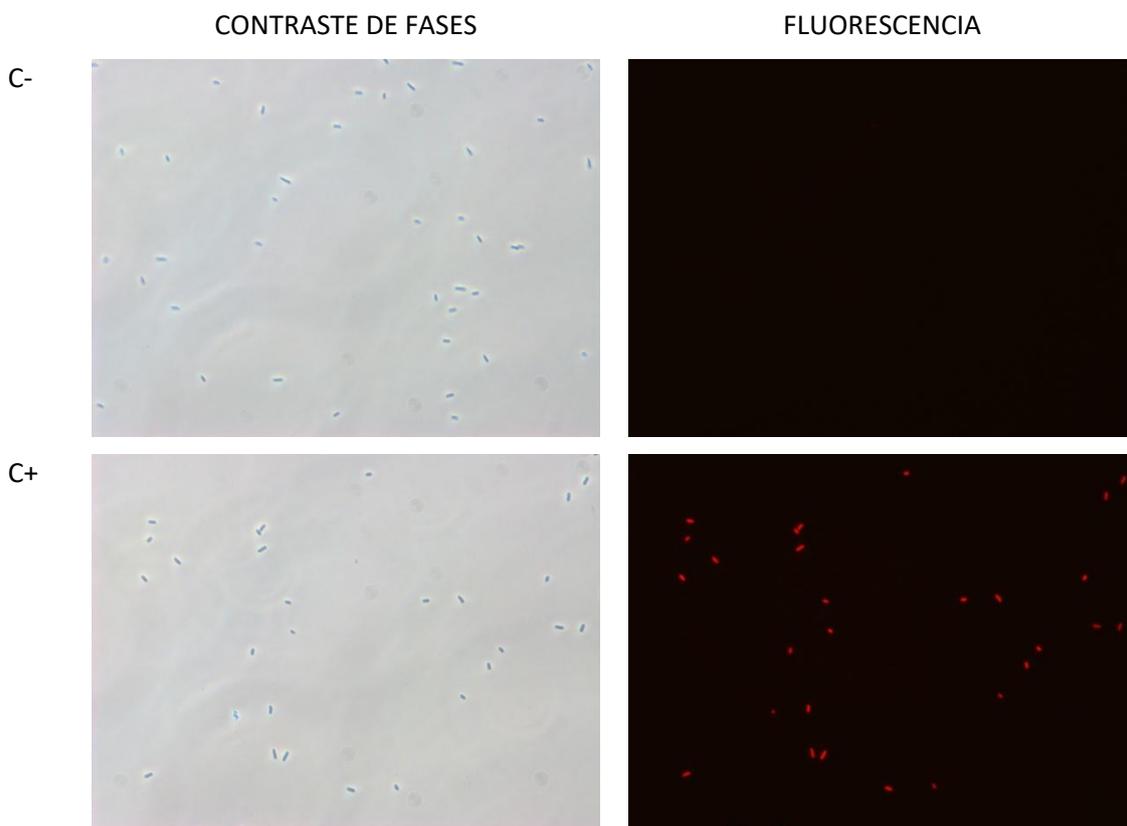


Figura 4.1.14. Fotografías obtenidas tras la observación en el microscopio de contraste de fases-epifluorescencia de los controles negativo y positivo teñidos con DHE.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este caso, a diferencia de lo que ocurría al analizar ambos controles mediante citometría de flujo, sí que se observa ausencia de tinción en el control negativo y 100 % de tinción en el control positivo, por lo que esta metodología se consideró más adecuada, en posteriores experimentos, a la hora de determinar el porcentaje de células de *E. coli* teñidas con DHE. No obstante, las determinaciones con el citómetro resultan útiles para estimar la fluorescencia total calculando el área bajo la curva en los histogramas.

- **HPF (hidrofenil fluoresceína).**

Para determinar las condiciones de tinción de este colorante se siguió el mismo desarrollo metodológico explicado anteriormente para los colorantes H₂DCFDA y DHE. El control negativo consistió en células nativas de *E. coli* BW25113 y el control positivo consistió en células de este mismo microorganismo tratadas con 50 mM de H₂O₂ durante 30 minutos. En este caso, se estudió un rango de concentraciones de este colorante comprendido entre 1 y 50 μ m y tiempos de tinción de 60, 90 y 120 minutos. En la figura 4.1.15 se muestran a modo de ejemplo los histogramas obtenidos a 50 μ m. En ninguna de las condiciones estudiadas se observó separación de los picos. Además, se observó que conforme se aumentaba el tiempo de tinción y la concentración de HPF usado el control negativo se desplazaba en la misma dirección que el control positivo, por lo que parecía indicar que este equipo detectaba la misma proporción de células teñidas en el control negativo que en el control positivo.

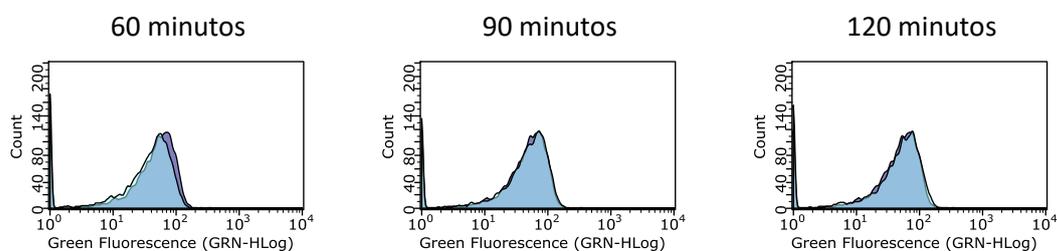


Figura 4.1.15. Diferentes condiciones de tiempo de tinción con HPF (50 μ m) estudiadas con el fin de determinar las condiciones finales de tinción. Histograma del control negativo (pico azul claro), histograma del control positivo (pico gris).

Dado que, tras numerosos intentos, usando el citómetro de flujo no conseguimos obtener una separación adecuada de los histogramas, y, por lo tanto, no pudimos determinar unas condiciones adecuadas de tinción, se realizó un experimento similar utilizando el microscopio de contraste de fases y epifluorescencia. Para ello se realizaron los controles negativo y positivo y se teñieron las células con concentraciones de HPF de 10, 50 y 100 μ m durante 60 y 90 minutos. Como muestra la figura 4.1.16 concentraciones de HPF de 10 μ m no teñían el control positivo, y, en cambio, con concentraciones de 50 y 100 μ m sí que se observaba

tinción. Sin embargo, la concentración más elevada de HPF estudiada (100 μm) producía en algunos casos fluorescencia de base, por lo que era necesario lavar las células varias veces, lo que dificultaba el procesado de estas muestras y, además, las células sufrían el riesgo de perder tinción con los lavados. Por ello, las condiciones elegidas fueron de 50 μm / 90 minutos, ya que estas condiciones permitían una tinción del 100 % de las células del control positivo, sin teñir el control negativo (Figura 4.1.17). En este caso, siempre se utilizó el microscopio de epifluorescencia por la imposibilidad de utilizar el citómetro de flujo.

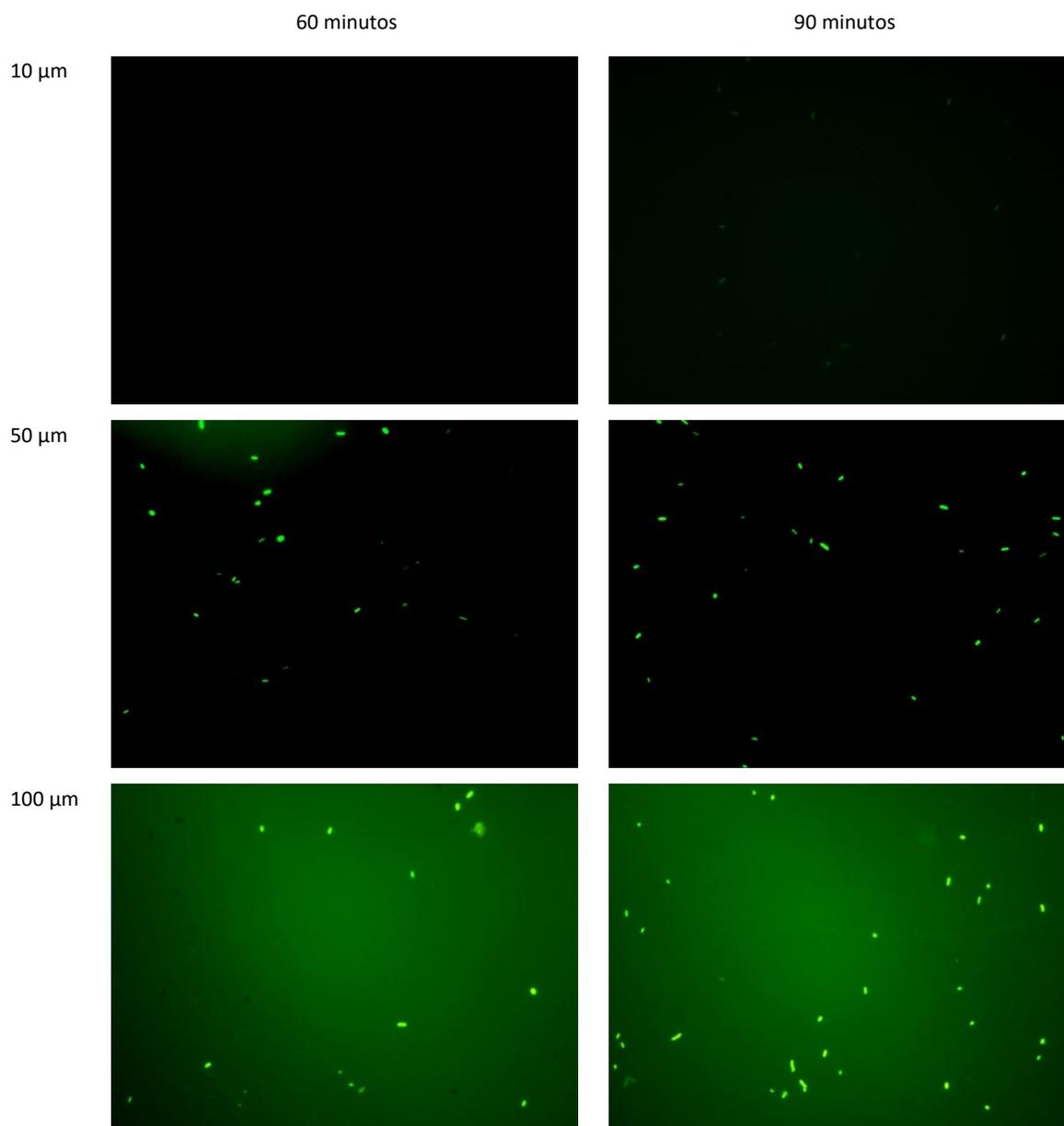


Figura 4.1.16. Fotografías obtenidas con el microscopio de fluorescencia tras la tinción del control positivo (células de *E. coli* BW25113 tratadas con 50 mM de peróxido de hidrógeno) con diferentes condiciones de tiempo-concentración de HPF.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al igual que se ha descrito en el caso de las tinciones con H₂DCFDA, las condiciones de tinción elegidas difieren de las descritas por otros autores en la bibliografía (Mols y col., 2009; Hwang y col., 2012; Renggli y col., 2013), ya que con estas condiciones no se observó tinción del control positivo en ninguno de los casos. Esto podría ser debido a que los estudios llevados a cabo por otros autores no se realizaron en la misma especie microbiana utilizada en esta Tesis. Además, estos autores determinaron la tinción con HPF mediante citometría de flujo, pero a diferencia de éstos, a lo largo de la presente investigación no se ha logrado determinar unas condiciones de tinción adecuadas para procesar las muestras con esta metodología, posiblemente debido al equipo del que se dispone, y a la menor intensidad de tinción con este colorante, que además presentaba un acusado fenómeno de pérdida de intensidad o apagamiento (“fading phenomenon”).

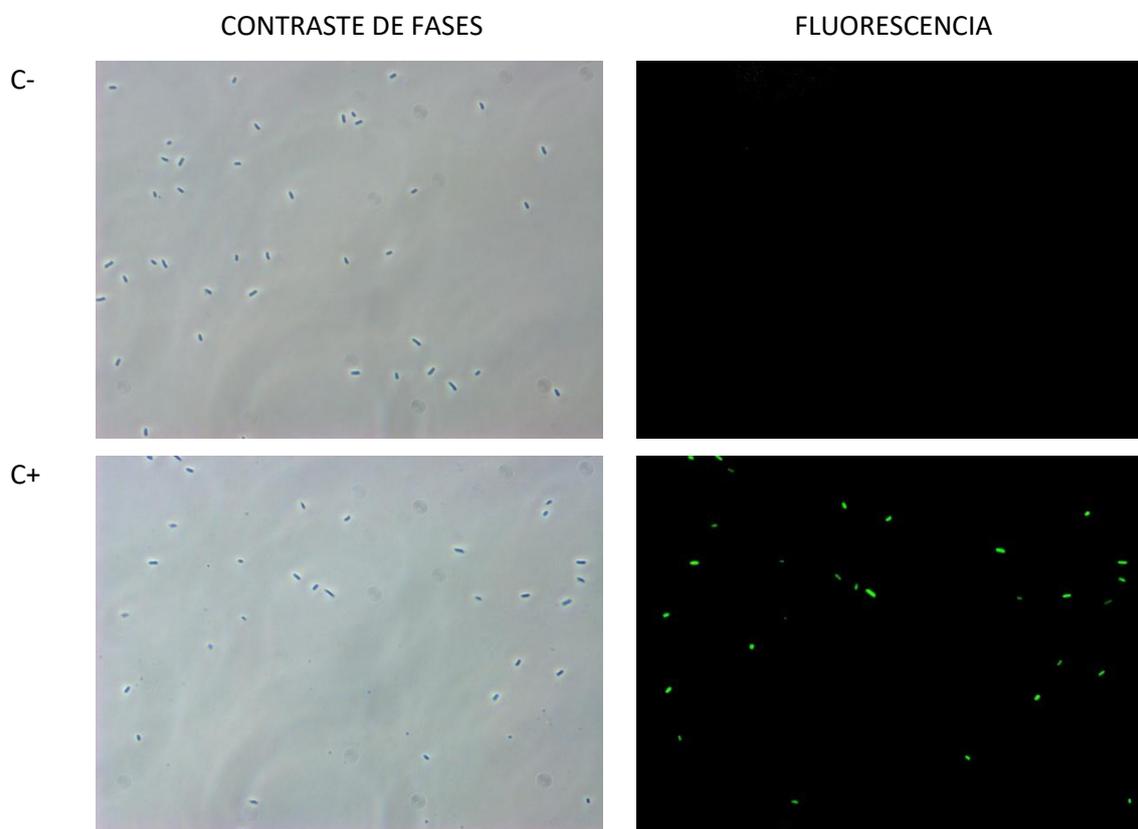


Figura 4.1.17. Fotografías obtenidas con el microscopio de contraste de fases y epifluorescencia de los controles negativo y positivo teñidos con las condiciones finales elegidas de HPF (50 μ m / 90 minutos).

Estos resultados ponen de manifiesto la dificultad de la interpretación de los datos de tinción de fluorescencia, especialmente con partículas de muy pequeño tamaño como las células de *E. coli*, para cuya enumeración y detección individual es conveniente utilizar citómetros con láseres de elevada potencia. Por otro lado, cada fluorocromo presenta unas

características ópticas diferentes, y probablemente, en el caso del HPF, sea necesaria la exposición a la luz de excitación durante más tiempo y/o potencia de lo que es capaz de emitir el láser disponible en nuestro equipo. En consecuencia, y como se ha descrito en la sección de Material y Métodos, en esta Tesis se utilizaron las dos técnicas, citometría de flujo y microscopía de fluorescencia de manera complementaria para la obtención de los datos de tinción celular de *E. coli*.

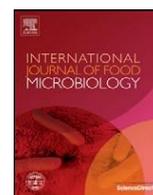
4.2 Estrés oxidativo e inactivación por calor.

- **Manuscrito I: Oxidative stress in *E. coli* cells upon exposure to heat treatments.**
- **Manuscrito II: Exposure to oxygen and bacterial survival to heat treatments.**



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicroOxidative stress in *E. coli* cells upon exposure to heat treatmentsMaría Marcén, Virginia Ruiz, M^a Jesús Serrano, Santiago Condón, Pilar Mañas*

Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria de Zaragoza, Instituto Agroalimentario de Aragón- IA2 (Universidad de Zaragoza-CITA), Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 May 2016

Received in revised form 13 October

2016 Accepted 17 October 2016

Available online 18 October 2016

Keywords:

Escherichia coli

Reactive oxygen species

Heat treatment

Recovery

ABSTRACT

Heat treatments are widely used by the food industry to inactivate microorganisms, however their mode of action on microbial cells is not fully known. In the last years, it has been proposed that the generation of oxidative species could be an important factor contributing to cell death by heat and by other stresses; however, investigations in this field are scarce. The present work studies the generation of reactive oxygen species (ROS) upon heat treatment in *E. coli*, through the use of cell staining with specific fluorochromes. Results obtained demonstrate that ROS are detected in *E. coli* cells when they are subjected to heat exposure, and the amount of fluorescence increases with temperature and time, as does the cellular inactivation. The addition of glutathione or tiron, a potent antioxidant and a superoxide quencher, respectively, to the heating medium protected *E. coli* against heat inactivation and concurrently reduced the detection of ROS, especially in the case of glutathione. Finally, recovery of heated cells under conditions that relief oxidative stress produced an increase in cell survival. Data presented in this work support the view that ROS generation and subsequent control in bacterial cells could be an essential factor determining inactivation and survival upon exposure to heat, and it could be a potential target to increase the efficacy of current treatments.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved

1. Introduction

Food preservation relies on the application of control measures, mainly directed towards pathogenic and spoilage microorganisms. Such measures represent a stress for the microorganisms present in foods, and may be aimed either to control microbial growth, such as high salt or acid concentration, or to inactivate microorganisms, such as heat treatments or high hydrostatic pressure (HHP). In the last years, a great effort has been focused towards gaining knowledge on the cellular events that take place in microbial cells exposed to food preservation related stresses. The final objective of these studies is to obtain a better profit of the existing technologies, through the increase of their lethal effect on microorganisms, or through the design of more effective combinations of different technologies, among other approaches.

Thermal treatments are still one of the most widely used methods to inactivate bacteria in foods. With regards to the mode of action of heat on microorganisms, some relevant advances have been reported; however, many aspects still remain unclear. It is generally acknowledged that heat shows a multitarget mode of action in bacteria, causing damage in different cell structures such as the envelopes, DNA, RNA, ribosomes and particular enzymes (Mackey, 2000; Nguyen et al., 2006). Despite much research effort has been dedicated to this field of study

in the last decades, the final events leading to cell death in heated bacterial cells are not clear. An aspect that is gaining attention is the involvement of an oxidative component in the inactivation of cells exposed to agents that are not direct oxidant chemical compounds, such as heat, in the so-called secondary oxidative stress (Mols and Abee, 2011).

Oxidative stress is defined as an imbalance between prooxidant and antioxidant substances in favor of prooxidant ones. High levels of oxidant species in the microbial cytoplasm, including reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), may produce damage in different cell components such as proteins, membranes and genetic material (Imlay, 2003). Bacterial cells have certain capacity to eliminate these reactive species and repair injured structures, however if this capacity is exceeded the cell viability is compromised. The cellular defense mechanisms against oxidative stress include detoxifying enzymes, such as superoxide dismutase or catalase, which eliminate superoxide radicals and peroxides, respectively; glutathione and thioredoxin systems which reduce disulfide bonds in oxidized proteins; DNA binding proteins with iron fixing properties and nonspecific reducing activity substances as FADH₂ and NADPH (Storz and Zheng, 2000; Gusarov and Nudler, 2005). Besides, there are complex systems which repair damage to macromolecules, such as chaperones and proteases, or DNA-repair enzymes, among others.

The occurrence of an oxidative component has been demonstrated for bacterial cells treated by several food preservation related stresses like HHP, acids and essential oils, by the use of various experimental approaches (Aertsen et al., 2005; Cebrián et al., 2009; Mols et al., 2009;

* Corresponding author at: Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, C/ Miguel Servet, 177, 50013 Zaragoza, Spain.
E-mail address: manas@unizar.es (P. Mañas).

Chueca et al., 2014). For instance, it has been reported that some bacterial strains treated by HHP survive better if they are recovered under anaerobic conditions (Aertsen et al., 2005; Cebrián et al., 2009), and that some mutant strains deficient in genes related to redox homeostasis control and DNA repair are more sensitive to this technology (*trxB*, *gshA*, *sodA*, *soxS*, *polA*, *recA*, *xthA*) (Charoenwong et al., 2011). With regards to heat treatments, indirect evidences of the involvement of oxidative stress on bacterial inactivation also exist. Some DNA repair deficient mutants are more sensitive to heat treatments (Mackey and Seymour, 1987), and after heat exposure some strains recover better in conditions of anaerobiosis, in the presence of detoxifying enzymes, in the presence of ROS quenchers, or in minimal medium, which lacks hydrogen peroxide (Mackey and Seymour, 1987; Bromberg et al., 1998; George and Peck, 1998; Cebrián et al., 2007; Sagarzazu et al., 2010). More recently, scattered investigations have demonstrated that exposure to heat induces an increase in ROS detection in bacterial cells (Baatout et al., 2005; Mols et al., 2009; Arku et al., 2011; Mols et al., 2011). Mols et al. (2011) suggested that this could be a common mechanism involved in cell death by various agents and that ROS formation could be due to malfunctioning of the electron transport chain. However the intensity and relevance of this phenomenon and the possible implication in cell inactivation and survival remains unknown.

Despite the importance of oxidative stress and maintenance of the cellular redox homeostasis, this is a factor that has been traditionally underestimated in investigations about microbial inactivation and survival to food preservation technologies. This research studies the presence of ROS in *E. coli* cells subjected to heat treatments, and explores the possible relationship between occurrence of oxidative stress and cell inactivation.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

Escherichia coli BW25113, W3110, CECT 471 and BJ4 were used in this study. The strains were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. To prepare precultures, flasks containing 10 ml of sterile TSBYE (Tryptic Soy Broth with 0.6% Yeast Extract, Oxoid, Basingstoke, UK) were inoculated with one single colony from a TSAYE plate (Tryptic Soy Agar with 0.6% Yeast Extract, Oxoid). The precultures were incubated overnight at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, under agitation. Subsequently, cultures were obtained by inoculating a flask with 50 ml TSBYE with 100 μl of the preculture, and incubating at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ under agitation, until stationary phase of growth was reached after 18–24 h incubation (2×10^9 cfu/ml, approximately).

2.2. Heat treatment

To determine the heat resistance of *E. coli*, a thermoresistometer TR-SC was used (Condón et al., 1993). The instrument consists of a 400 ml vessel provided with an electrical heater for thermostation, an agitation device to ensure inoculum distribution and temperature homogeneity, and ports for injecting the microbial suspension and for the extraction of samples. 350 ml of sterile PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma, San Louis, USA) were placed in the vessel of the TR-SC and heating was switched on. Once the PBS reached the desired temperature (50, 54, 58 or $62 \pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$), it was inoculated with 0.2 ml of an adequately diluted microbial cell suspension. After inoculation, 0.2 ml samples were collected at different heating times, immediately plated and incubated for survival counting. Occasionally, heat treatments were carried out in test tubes submerged in a thermostated water bath. The objective of these experiments was to obtain treated cells at concentration $\geq 10^7$ cells/ml, to be examined under the microscope, since the concentration normally used in the thermoresistometer TR-SC was insufficient for that purpose.

In some experiments, substances with proven redox activity were added to the heating medium. These included L-cysteine hydrochloride

(10 mM) (Sigma Aldrich), reduced L-glutathione (10 mM) (Sigma Aldrich), 2,2'-bipyridyl (0.02 mM) (Sigma Aldrich), thiourea (150 mM) (Sigma Aldrich), 4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic acid disodium salt monohydrate (Tiron, 20 mM) (Sigma Aldrich), D-mannitol (50 mM) (Sigma Aldrich) and sodium pyruvate (90 mM) (Panreac, Barcelona, Spain). The concentrations were chosen according to the literature (Kari et al., 1971; Ferguson and Booth, 1998; Yang et al., 2001; Santo et al., 2008; Wang et al., 2010; Johnson et al., 2014). These concentrations did not affect *E. coli* BW25113 growth either in liquid or in solid media (data not shown).

2.3. Recovery after heat treatment

After heat treatment, samples were plated in TSAYE, and plates were incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in aerobic conditions and after 24–72 h colony forming units were counted. Although these were the standard recovery conditions used in most experiments, in some cases cells were also recovered under different conditions. On the one hand, the atmosphere composition was changed. Where indicated in the text, survivors were recovered in a variable atmosphere incubator (MACS VA500, Don Whitley Scientific Limited, Shipley, United Kingdom), with a gas composition of 0% oxygen, 5% hydrogen, 5% carbon dioxide and 90% nitrogen, plus the palladium catalyzer, to create anaerobic atmosphere.

On the other hand, the recovery medium was also modified in particular experiments, where cells were also recovered in TSAYE enriched with 10 mM L-glutathione and in minimal M9 glucose-salts agar enriched with 3 mM L-cysteine HCl. These conditions were chosen to create a low-oxidative stress environment in order to improve the recovery of ROS-sensitized cells. M9 agar was prepared as described elsewhere (Gerhardt et al., 1994) and supplemented with FeSO_4 (10 mg/l) to improve bacterial growth (Stanier et al., 1992), and with cysteine to create a low redox potential environment (Gerhardt et al., 1994; Suh and Knabel, 2000).

To construct survival curves, the fraction of survivors ($\text{Log } N_t/N_0$) was represented vs the treatment time (minutes). All the experimental determinations of heat resistance were performed at least 3 times with independent microbial cultures, and data in figures correspond to the average and the mean standard deviation (error bars).

2.4. ROS determination

The presence of ROS in cells due to heat treatment was studied through staining with specific fluorochromes followed by flow cytometry and/or epifluorescence microscopy. Heated cells were collected after different exposure times and stained separately with H_2DCFDA (2',7'-dichloro-dihydro-fluorescein diacetate) or DHE (dihydroethidium).

Treated cells, at approximately 10^5 cells/ml in PBS, were incubated with the fluorescent dye, then centrifuged and resuspended in filtered PBS (0.22 μm). A positive and a negative control of staining were always included. The negative control corresponded to untreated cells, whereas the positive control consisted of cells exposed to hydrogen peroxide (10 mM/30 min) (Sigma Aldrich) in the case of H_2DCFDA , and of cells treated with the superoxide-generating agent plumbagin (Sigma Aldrich) (5.3 mM/10 min) in the case of DHE (Hassan and Fridovich, 1979; Farr et al., 1985).

Fluorescent signals obtained with H_2DCFDA and DHE stained cells were quantified through flow cytometry. The cytometer (Guava EasyCyte, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) was calibrated with fluorescent beads (Guava easyCheck Bead Reagent, Merck Millipore), according to the manufacturer's instructions. The samples were introduced into the cytometer at 0.59 $\mu\text{l/s}$ and a 488 nm laser was used for excitation. The threshold was set with the forward scatter (FSC) to 80 mV, to distinguish the cells from the debris and electronic noise, and the values for the photomultiplier tube were: 53.8 (FSC), 79.5 (SSC) and 29.3 (GRN and RED). A band-pass filter of 695 nm was used to collect the red fluorescence and a band-pass filter of 525 nm was used to collect

the green fluorescence. Data were obtained (5000 events) and analyzed using the Software GuavaSoft 2.7 (Millipore, Darmstadt, Germany). Results were expressed using histograms, which represent the distribution of fluorescence level among the cells in the population (number of events vs level of fluorescence). The area under the curve in the histogram was used as a total fluorescence measurement, and was calculated with the Excel software (Microsoft Office 2007).

To choose adequate staining conditions, different concentrations and different contact times of each dye were tested. In the case of H₂DCFDA three concentrations (5, 50 and 500 μ M) and different contact times (5, 30, 60, 90 and 120 min) were tested. After applying these conditions, the histograms (number of cells vs green fluorescence level) corresponding to untreated and hydrogen-peroxide treated cells stained with H₂DCFDA were observed and final staining conditions were chosen. In general, total fluorescence increased with the dye concentration and contact time up to a maximum, thus the conditions chosen were those which allowed a better separation of peaks corresponding to the positive and the negative controls. A similar procedure was followed for DHE. Final staining conditions chosen were 50 μ M/90 min in both cases.

Occasionally, the results obtained with flow cytometry were completed using fluorescence microscopy, in order to obtain a more direct estimation of the percentage of cells stained with DHE, since flow cytometry did not always allow peaks to be completely resolved. In this case cells were stained following the same procedure, but using a higher cell concentration (10^7 – 10^8 cfu/ml). A Nikon Eclipse E400 phase contrast and fluorescence microscope (Nikon Corporation, Japan) was used, images were obtained with a high resolution camera (AxioCam MRc, Zeiss, Germany) and processed with the software ZEN 2012 (Zeiss, Germany). Total and fluorescent cells were counted from photographs taken from each sample.

All the staining experiments, either by cytometry or microscopy, were carried out at least in duplicate with independent bacterial cultures. Data in figures correspond to the average and the mean standard deviation (error bars).

2.5. Propidium iodide staining

Additionally, the permeabilization of the membrane due to the exposure of cells to heat treatment was also studied. For this purpose, after heat treatments, cells were stained with propidium iodide (PI, 3 μ M/30 min), following a similar protocol to that described for H₂DCFDA and DHE, and observed by fluorescence microscopy. Cells with permeabilized membranes allow the entrance of the dye inside the cell, rendering cells with intense red fluorescence.

2.6. Statistical analysis

Student's t tests were carried out using the GraphPad PRISM 5 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA), and differences were considered significant for $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Exposure of *E. coli* cells to heat causes an increase of ROS

The heat resistance of *E. coli* BW25113 was evaluated in PBS at 50, 54, 58 and 62 °C. Fig. 1 shows the survival curves of *E. coli* at the four temperatures studied. The inactivation level was similar to that obtained by other authors with other strains of *E. coli* (Benito et al., 1999; Cebrián et al., 2007).

Subsequently, the presence of ROS in heat treated cells was assessed. For this purpose, cells were stained with H₂DCFDA and DHE. H₂DCFDA (2',7'-dichloro-dihydro-fluorescein diacetate) is a membrane-permeant dye that is enzymatically hydrolyzed by intracellular

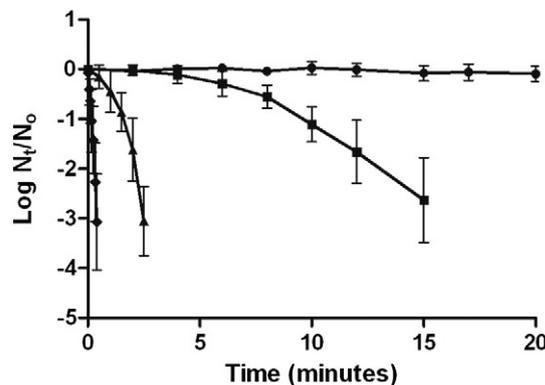


Fig. 1. Survival curves of *E. coli* at 50 °C (●), 54 °C (■), 58 °C (▲) and 62 °C (◆). Data points in figures correspond to the average \pm standard deviation ($n \geq 3$).

esterases to DCFH, which is oxidized to render a green fluorescent compound (DCF, 2, 7-dichlorofluorescein). H₂DCFDA is considered as a general oxidative stress indicator, being able to react with H₂O₂, hydroxyl (OH•) and peroxy radicals (ROO•) and also with some reactive nitrogen species (RNS) (Gomes et al., 2005). On the other hand, DHE has been widely used as a permeant probe for the detection of superoxide (O₂^{•-}) due to its specificity for this radical. DHE is oxidized by superoxide, originating oxyethidium, which is a compound that binds to DNA rendering fluorescence in red (Gomes et al., 2005). Despite it has been shown that oxidation of DHE is not completely specific to superoxide anion (Patsoukis et al., 2005), DHE and its derivatives continue to be a commonly used probe for superoxide detection.

The adequacy of the two dyes here used was checked through the use of the controls. Untreated cells did not exhibit significant fluorescence upon staining with any of the dyes. Cells exposed to H₂O₂ were strongly stained with H₂DCFDA, whereas plumbagin-exposed cells showed red fluorescence when they were stained with DHE. These results were tested by cytometry and also by fluorescence microscopy (data not shown). In order to check the specificity of the dyes, cells exposed to H₂O₂ were stained with DHE and cells exposed to plumbagin were stained with H₂DCFDA. Whereas in this latter case no staining was detected, cells exposed to H₂O₂ showed some low-intensity fluorescence when stained with DHE (data not shown). In fact, Patsoukis et al. (2005) showed that DHE can be also oxidized by H₂O₂ via non-specific peroxidase catalysis. However we cannot discard that exposure to H₂O₂ provoked the generation of superoxide due to extensive damage to the cytoplasmic membrane and thus, to the electron transfer chain. In summary, although the two dyes showed clear affinity for particular ROS, H₂DCFDA for peroxide and DHE for superoxide, in the case of DHE it cannot be discarded that other oxidative species may somehow contribute to the fluorescence detected.

As a first approach, the presence of ROS in cells treated at 58 °C was evaluated. Fig. 2 includes the phase contrast and epifluorescence microphotographs of *E. coli* BW25113 cells stained with H₂DCFDA (panel A) and DHE (panel B). It can be observed that heat-treated cells (58 °C/3 min) presented staining with the two dyes. These results confirmed that ROS formation occurred in *E. coli* BW25113 upon heat treatment.

It is also remarkable that, under the treatment conditions here used (58 °C/3 min), most of the cells were stained with DHE, whereas in the case of H₂DCFDA, only a percentage of the cells showed fluorescence. Fig. 3A and B includes the total fluorescence calculated from the histograms after different treatment times at 58 °C. Results are expressed as the total area under the curve in the histogram (A_t) minus the area corresponding to non-treated cells (A₀). As it can be observed in the graphs, whereas for cells stained with H₂DCFDA a maximum peak of fluorescence was observed after approximately 4 min at 58 °C and further exposure to heat caused a decrease in fluorescence, for cells stained

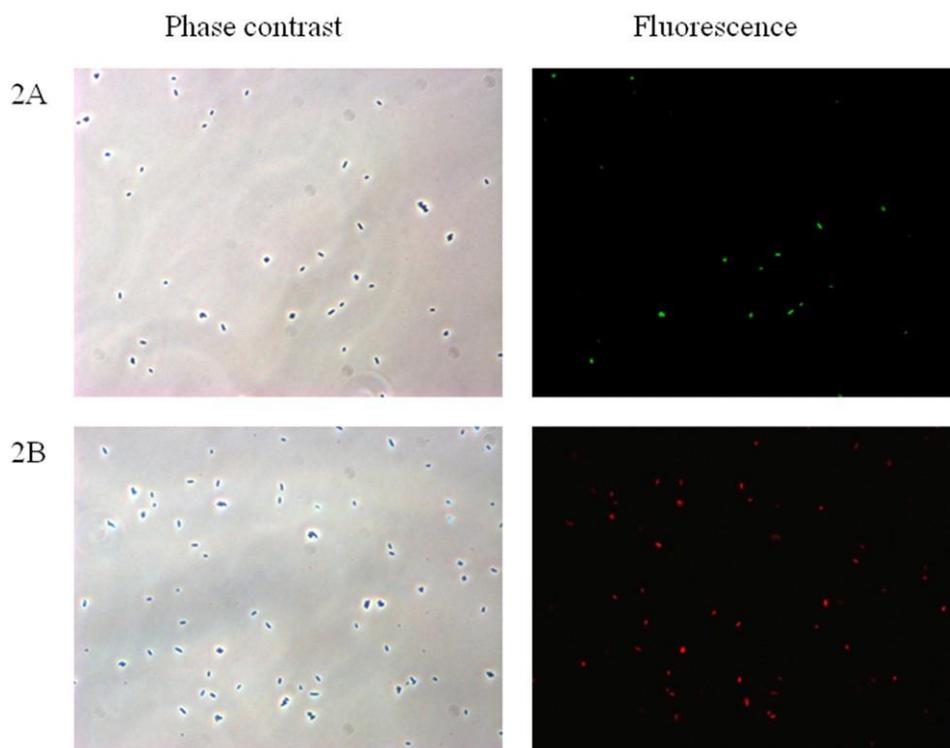


Fig. 2. The presence of ROS in cells treated at 58 °C: representative phase contrast and epifluorescence microphotographs of *E. coli* cells heated for 3 min and stained with H₂DCFDA (A) and DHE (B)

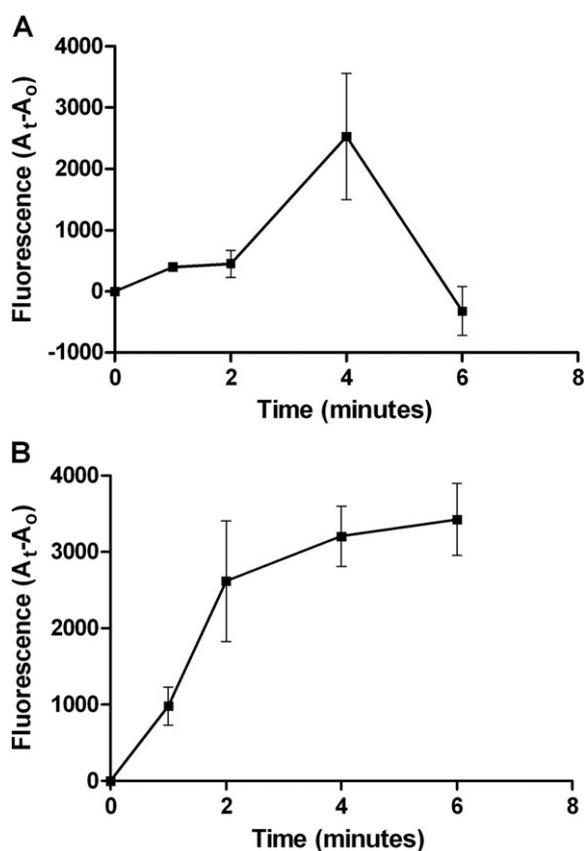


Fig. 3. Total fluorescence of *E. coli* cells heated at 58 °C up to 6 min and stained with H₂DCFDA (A) and DHE (B) (n ≥ 3).

with DHE a gradual increase in fluorescence was observed up to 4–6 min of treatment.

In order to know if the generation of ROS was particular to this *E. coli* strain, experiments were carried out with other three strains (W3110, CECT 471 and BJ4). Results obtained confirmed that ROS formation occurred in other strains and it could be a common effect during thermal treatment. DHE staining increased with treatment time in all the strains (Fig. 4). In addition, in all the strains, the detection of fluorescence with the dye H₂DCFDA was similar to that previously observed with strain BW25113, and fluorescence decreased after a maximum peak (data not shown).

3.2. Influence of treatment temperature and time on ROS generation

In order to study the kinetics of ROS production, cells were treated at different temperatures and times, stained with DHE and analyzed by

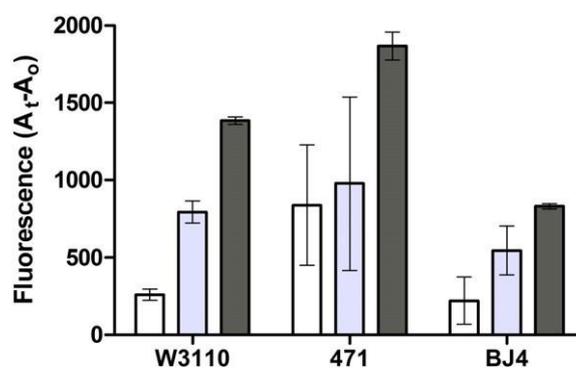


Fig. 4. ROS generation during heat of different strains of *E. coli* (W3110, CECT 471, BJ4): total fluorescence of cells treated at 58 °C for 1 (white), 2 (light grey) and 5 min (dark grey) and stained with DHE (n = 2).

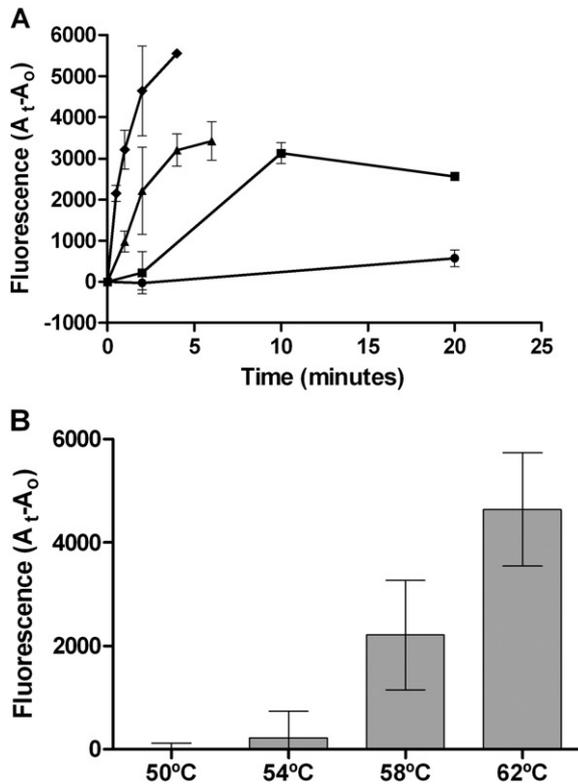


Fig. 5. Influence of treatment temperature and time on ROS formation (DHE staining) in heat treated *E. coli* BW25113 cells: (A) total fluorescence along treatments at 50 °C (●), 54 °C (■), 58 °C (▲) and 62 °C (◆); and (B) total fluorescence after 2 min of treatment ($n = 2-4$).

flow cytometry. Fig. 5A represents the evolution of total fluorescence along treatments at 50, 54, 58 and 62 °C. Fig. 5B includes data obtained after a constant treatment time (2 min) at the four temperatures tested, for comparison purposes.

As it can be observed in the graphs, the amount of fluorescence increased with treatment time for all the treatment temperatures tested, and it appeared that tended to reach a plateau (Fig. 5A). The increase in fluorescence was faster the higher the temperature, and for a fixed exposure time (Fig. 5B), the amount of fluorescence increased with temperature.

3.3. Influence of the presence of different substances with redox activity in the treatment medium on *E. coli* survival and ROS formation

The influence of the addition of a variety of substances to the heating medium on cell survival was studied. These substances were selected because they possess either antioxidant activity or they have been used as quenchers of several ROS or ROS-related compounds. Glutathione was added due to its proven antioxidant activity at different cellular levels (Smirnova and Oktyabrsky, 2005). Cysteine was added due to its capacity of eliminating oxygen from the medium and decreasing its redox potential (Suh and Knabel, 2000). Bipyridyl was added because it is a permeant iron-binding substance, thus reducing the intensity of the formation of hydroxyl radicals via Fenton reaction (Imlay et al., 1988; Gusarov and Nudler, 2005). Thiourea and mannitol have been used as hydroxyl radical quenchers (Whiteman and Halliwell, 1997; Wisselink et al., 2002); pyruvate was added to culture media as H₂O₂ quencher (Mackey, 2000), and tiron has been described as superoxide quencher (Krishna et al., 1992). Results obtained are shown in Table 1, where the Log cycles of inactivation after a 3 min exposure to 58 °C in PBS with and without these compounds are included. From the variety of substances used, glutathione and tiron were selected since they

Table 1

Influence of the addition of substances with selected quenching and/or redox activity to the heating medium (58 °C/3 min) on the inactivation of *E. coli* BW25113.

	Log cycles of inactivation
PBS (control)	2.83 ± 0.15
Glutathione	0.95 ± 0.06*
Cysteine	3.46 ± 0.31
Bipyridyl	2.82 ± 0.64
Thiourea	3.87 ± 0.10*
Mannitol	3.07 ± 0.42
Pyruvate	2.13 ± 0.60
Tiron	1.75 ± 0.24*

* Significantly different from control ($p < 0.05$).

exerted a significant thermo-protective effect on *E. coli* cells ($p \leq 0.05$), which was especially relevant in the case of glutathione.

Fig. 6A includes the inactivation attained after a heat treatment at 58 °C of *E. coli* BW25113 in PBS alone and with tiron (20 mM) and glutathione (10 mM) added. Cells were stained with DHE and the total fluorescence determined (Fig. 6B). Cells were stained in the same medium that had been used before for heating, thus, the effect of glutathione and tiron has to be ascribed to heating plus the following post-treatment staining period. As it can be observed in the graphs, the presence of either tiron or glutathione protected *E. coli* against heat inactivation, and also reduced the intensity of ROS occurrence in the cells.

3.4. Relationship between ROS formation, membrane permeabilization and cell inactivation

In order to gain a deeper knowledge about the cellular mechanisms involved in cell inactivation and survival, cells were stained with DHE

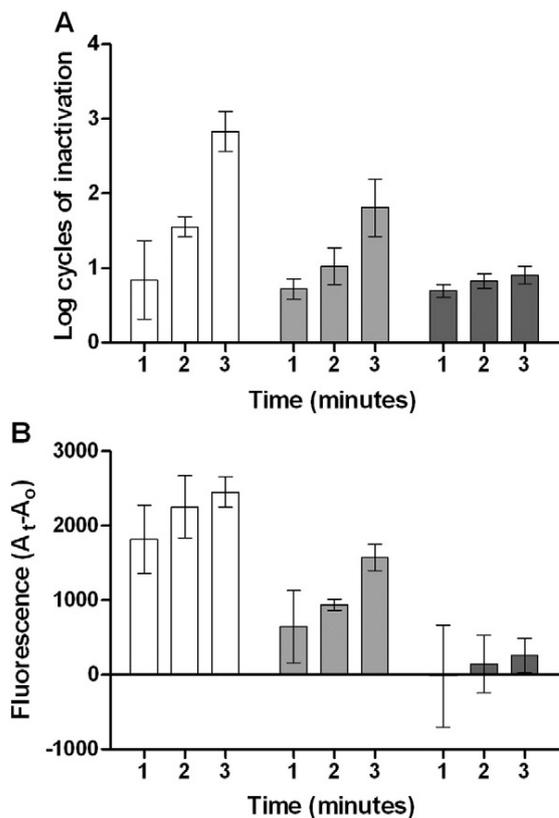


Fig. 6. Inactivation of *E. coli* BW25113 after a heat treatment (58 °C; 1, 2 and 3 min) in PBS (white), PBS with 20 mM tiron (light grey) and PBS with 10 mM glutathione (dark grey) (A), and fluorescence corresponding to DHE staining after heating (B) ($n=3$).

and with PI, with the aim of studying the possible link between ROS formation, membrane permeabilization and cell inactivation. The percentage of cells stained with each of the dyes used was determined microscopically by epifluorescence and phase contrast. Results are shown in Fig. 7, where the percentage of inactivated cells, evaluated as cells unable to outgrow in TSAYE and aerobiosis, and the percentage of fluorescent cells upon staining either with DHE or with PI after different heating times are included.

As it can be observed in the graph, the percentage of inactivated cells was closer to the percentage of cells stained with DHE than to PI-permeabilized cells. For instance, after 2 min of exposure to 58 °C, 93% of the cells had lost viability, 95% of cells were stained by DHE, and only 19% were permeable to PI.

3.5. Cell recovery after treatment under conditions that relief oxidative stress

Cells were subjected to a treatment at 58 °C, and they were subsequently recovered under different experimental conditions. Conditions included the standard recovery conditions (TSAYE, aerobiosis) and two conditions to reduce the level of oxidative stress: TSAYE plus 10 mM glutathione (aerobiosis), and minimal medium with 3 mM cysteine added plus anaerobic incubation. Fig. 8 shows the survival curves obtained. As it can be observed in the graph, cellular recovery improved in both conditions, as compared to TSAYE/aerobiosis, and the protective effect was more notable for the recovery in cysteine-supplemented minimal medium under anaerobic atmosphere.

4. Discussion

In this investigation, we have demonstrated the occurrence of ROS in various strains of *E. coli* heat treated cells, supporting the results previously reported with other bacterial species (Baatout et al., 2005; Mols et al., 2009; Arku et al., 2011; Mols et al., 2011). Mols et al. (2011) affirmed that superoxide radicals were formed in *B. cereus* exponentially growing cells due to the treatment applied, and this coincides with the results obtained in this investigation with stationary phase *E. coli* cells. ROS detection increased with the intensity of the heat treatment, i.e. with longer exposure time and/or higher temperature, suggesting that the generation of ROS and/or the unbalance in the subsequent control within the cell could be a critical factor influencing cell death and survival upon exposure to heat.

We have observed that after particular treatment conditions, generally after the most intense treatments, a majority of the cells were stained with DHE, whereas only a percentage of the cells showed fluorescence with H₂DCFDA. These results may indicate that superoxide radical is formed more intensely, since superoxide is a precursor of other ROS including hydrogen peroxide and hydroxyl radical

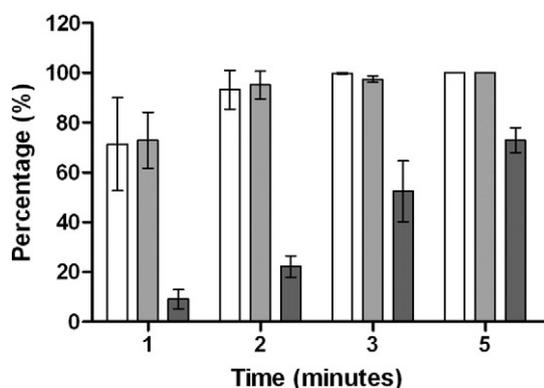


Fig. 7. Percentage of *E. coli* BW25113 inactivated cells (white), cells fluorescent to DHE (light grey) and to PI (dark grey) after different exposure times to heating at 58 °C (n ≥ 3).

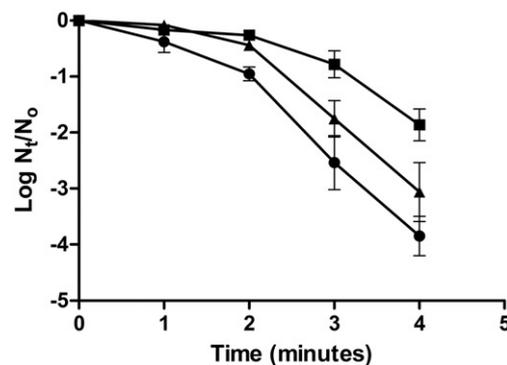


Fig. 8. Survival curves of *E. coli* BW25113 obtained at 58 °C when cells were recovered in TSAYE/aerobiosis (●), TSAYE with 10 mM of glutathione/aerobiosis (▲) and minimal medium plus 3 mM of cysteine/anaerobiosis (■) (n = 3).

(Lushchak, 2011; Imlay, 2013). Also, perhaps hydrogen peroxide and other radicals able to react with H₂DCFDA would be more efficiently removed by the cellular detoxifying machinery, i.e. by the action of catalases. Another possibility is that the fluorescent dye H₂DCFDA could be lost across a permeabilized membrane, after longer treatments. Finally, given the fact that the development of fluorescence upon staining with H₂DCFDA requires esterase enzymatic activity (Gomes et al., 2005), the heat treatment applied might have partly affected cellular esterases; thus the fluorescence observed would be the result of the balance between ROS generation and enzymatic activity drop. We would like to point that we also tested the use of HPF (hydroxyphenyl fluorescein), which is an indicator of the presence of hydroxyl radical whose signal does not depend on enzymatic activity. However, we did not detect strong enough fluorescence with this dye by the use of the flow cytometer, under our experimental conditions, in any of the samples of *E. coli*, including the positive controls and with a variety of staining conditions, so we discarded its use.

We also studied the effect of different substances which possess either antioxidant activity or they have been used as quenchers of several ROS or ROS-related compounds, and it was found that the presence of either tiron or glutathione protected *E. coli* against heat inactivation. It has to be noted that all the substances were used at a single concentration, with the only objective of detecting particular conditions that protected cells against heat inactivation through a redox-related mechanism. We cannot discard that a wider study, including different concentrations and experimental conditions, could reveal also protective effects for the rest of quenchers and substances here used. Tiron and glutathione protected cells against heat inactivation and also reduced the intensity of ROS formation in the cells. The protection exerted by tiron would be attributed to its superoxide quenching activity; supporting the view that superoxide was formed and was involved in the development of DHE fluorescence. The magnitude of the protective effect of glutathione was particularly important, both in cell inactivation and preventing ROS formation in cells. Glutathione is present in some Gram-negative prokaryotes at relatively high concentrations (Smirnova and Oktyabrsky, 2005), and it exerts its antioxidant action through several mechanisms, which include direct reaction with several free radicals, and thiol-disulfide interchange that help to recover the structure in altered proteins (Smirnova and Oktyabrsky, 2005). Further work is being carried out in our laboratory to gain insight into the actual mode of action of this compound.

Furthermore, this study tried to establish a relationship between the permeabilization of the membrane to PI and the formation of ROS. The results indicate that the permeabilization of the membrane to PI and the occurrence of ROS due to the heat treatment were independent phenomena, since most DHE-positive cells were not permeable to PI. This would suggest that the formation of ROS upon heating would not be a consequence of membrane damage and subsequent electron transport

chain disturbance, as suggested by other authors (Mols et al., 2011). Other mechanisms may be playing a role, such as for instance the destabilization of other cellular structures or the loss of activity of cellular defensive systems, although it cannot be discarded that more subtle membrane alterations may occur in heated cells, before permanent permeabilization to PI takes place.

All the results described so far in this investigation suggested that the occurrence of ROS would be a cellular event that could be related somehow to cell inactivation. However, it is well known that inactivation depends on the recovery conditions used. Bacterial cells subjected to a variety of stresses may suffer sublethal alterations in one or several structures and/or functions. This fact is particularly important in those agents that have a multitarget mode of action, such as heat (Mackey, 2000; Wuytack et al., 2003). If the environmental conditions are appropriate, sublethally injured cells may recover their damages, maintain cell internal homeostasis and resume growth after treatment. On the contrary, under adverse conditions, damaged cells may not be able to repair damages and may be inactivated. Standard recovery conditions used in this investigation were a nutritionally complex agar (TSAYE), and aerobic atmosphere. It has been reported that traces of peroxides and other ROS are formed in complex media upon autoclaving and exposure to UV light (Mackey, 2000; Stephens et al., 2000), and that factors like the tryptone that is added to culture media may influence the oxidative stress level of the cells (Stephens et al., 2000; De Spiegeleer et al., 2004). Thus, if heated cells contained a higher amount of ROS, either due to the direct action of heat on several components of the bacterial cell, or due to subtle alterations in the membrane, it is reasonable to think that these cells could be more sensitive after treatment to adverse conditions that involve an oxidative burden (Stephens et al., 2000). In fact, our results showed that cellular recovery was improved by the addition of glutathione, and also when recovery was carried out in minimal media enriched with cysteine and anaerobic atmosphere. It was checked that anaerobic recovery did not improve cell survival neither in TSAYE, nor in TSAYE plus glutathione (data not shown), fact that illustrates the complex relationship between media composition, atmosphere composition and cell physiological state. The results also suggest that the presence of superoxide radicals, despite being a good indicator of the level of cell alteration upon heating, could be partly counteracted in *E. coli* cells under some favorable environmental conditions. This fact is particularly important for food preservation strategies, where conditions which permit and favor cell recovery should be strongly avoided.

5. Concluding remarks

In summary, our results show that heat treatment causes a progressive increase of ROS in *E. coli* cells. While many authors have suggested that heat treatment produces oxidative stress in cells, only scattered investigations have described the direct formation of ROS in cells subjected to heating. Moreover we have also demonstrated for the first time that the detection of ROS and the amount of cells with ROS increase with treatment time and treatment temperature, and that this increase is always coincident with increases in cell inactivation degree upon exposure to heat. The addition of glutathione or tiron, a potent antioxidant and a superoxide quencher, respectively, to the heating medium protected *E. coli* against heat inactivation and also reduced the detection of superoxide. Our results also show that ROS presence seems to be independent from permanent membrane permeabilization to PI. Whether the formation of ROS derives from imbalances in the electron transfer chain due to more subtle membrane alterations, or from other cellular mechanisms, is something that remains to be elucidated.

Data presented in this work support the view that ROS generation and ulterior balance maintenance in bacterial cells is an essential factor determining inactivation and survival upon exposure to stressing agents, and it could be a potential target for the optimization of current food preservation procedures.

Acknowledgements

The authors would like to thank the European Regional Development Fund, MINECO-CICYT (AGL2012-33522, AGL2015-69565-P) and the Department of Innovation Research and University of the Aragon Government and European Social Fund (FSE) for the support (predoctoral grant M. Marcén, C093/2014).

References

- Aertsen, A., De Spiegeleer, P., Vanoirbeek, K., Lavilla, M., Michiels, C.W., 2005. Induction of oxidative stress by high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2226–2231.
- Arku, B., Fanning, S., Jordan, K., 2011. Flow cytometry to assess biochemical pathways in heat-stressed *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*). *J. Appl. Microbiol.* 111, 616–624.
- Baatout, S., De Boever, P., Mergeay, M., 2005. Temperature-induced changes in bacterial physiology as determined by flow cytometry. *Ann. Microbiol.* 55, 73–80.
- Benito, A., Ventura, G., Casadel, M., Robinson, T., Mackey, B., 1999. Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157 to high hydrostatic pressure, mild heat, and other stresses. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (4), 1564–1569.
- Bromberg, R., George, S.M., Peck, M.W., 1998. Oxygen sensitivity of heated cells of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Appl. Microbiol.* 85, 231–237.
- Cebrián, G., Sagarazu, N., Pagán, R., Condón, S., Mañas, P., 2007. Heat and pulsed electric field resistance of pigmented and non-pigmented enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* in exponential and stationary phase of growth. *Int. J. Food Microbiol.* 118 (3), 304–311.
- Cebrián, G., Aertsen, A., Sagarazu, N., Pagán, R., Condon, S., Mañas, P., 2009. Role of the alternative sigma factor σ^B on *Staphylococcus aureus* resistance to stresses of relevance to food preservation. *J. Appl. Microbiol.* 107 (1), 187–196.
- Charoenwong, D., Andrews, S., Mackey, B., 2011. Role of rpoS in the development of cell envelope resilience and pressure resistance in stationary-phase *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5220–5229.
- Chueca, B., Pagán, R., García-Gonzalo, D., 2014. Differential mechanism of *Escherichia coli* inactivation by (+) - limonene as a function of cell physiological state and drug's concentration. *PLoS One* 9 (4), e94072.
- Condón, S., Arrizubieta, M.J., Sala, F.J., 1993. Microbial heat resistance determinations by the multipoint system with the thermoresistometer TR-SC improvement of this methodology. *J. Microbiol. Methods* 18 (4), 357–366.
- De Spiegeleer, P., Sermion, J., Lietaert, A., Aertsen, A., Michiels, C.W., 2004. Source of tryptone in growth medium affects oxidative stress resistance in *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.* 97 (1), 124–133.
- Farr, S.B., Natvig, D.O., Kogoma, T., 1985. Toxicity and mutagenicity of plumbagin and the induction of a possible new DNA repair pathway in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 164 (3), 1309–1316.
- Ferguson, G.P., Booth, I.R., 1998. Importance of glutathione for growth and survival of *Escherichia coli* cells: detoxification of methylglyoxal and maintenance of intracellular K⁺. *J. Bacteriol.* 180 (16), 4314–4318.
- George, S.M., Peck, M.W., 1998. Redox potential affects the measured heat resistance of *Escherichia coli* O157: H7 independently of oxygen concentration. *Lett. Appl. Microbiol.* 27 (6), 313–317.
- Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N.R., 1994. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Vol. 1325. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J.L., 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods* 65 (2), 45–80.
- Gusarov, I., Nudler, E., 2005. NO-mediated cytoprotection: instant adaptation to oxidative stress in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (39), 13855–13860.
- Hassan, H.M., Fridovich, I., 1979. Intracellular production of superoxide radical and of hydrogen peroxide by redox active compounds. *Arch. Biochem. Biophys.* 196 (2), 385–395.
- Imlay, J.A., 2003. Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* 57 (1), 395–418.
- Imlay, J.A., 2013. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* 11 (7), 443–454.
- Imlay, J.A., Chin, S.M., Linn, S., 1988. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* 240 (4852), 640–642.
- Johnson, G.A., Ellis, E.A., Kim, H., Muthukrishnan, N., Snavely, T., Pellois, J.P., 2014. Photo-induced membrane damage of *E. coli* and *S. aureus* by the photosensitizer-antimicrobial peptide conjugate eosin-(KLAKLAK) 2. *PLoS One* 9 (3).
- Kari, C., Nagy, Z., Kovacs, P., Hernadi, F., 1971. Mechanism of the growth inhibitory effect of cysteine on *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 68 (3), 349–356.
- Krishna, C.M., Liebmann, J.E., Kaufman, D., DeGraff, W., Hahn, S.M., McMurry, T., Russo, A., 1992. The catecholic metal sequestering agent 1,2-dihydroxybenzene-3, 5-disulfonate confers protection against oxidative cell damage. *Arch. Biochem. Biophys.* 294 (1), 98–106.
- Lushchak, V.I., 2011. Adaptive response to oxidative stress: bacteria, fungi, plants and animals. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* 153 (2), 175–190.
- Mackey, B.M., 2000. Injured bacteria. In: Lund, M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food Vol. I*. Aspen Publisher, Gaithersburg, pp. 315–341.
- Mackey, B.M., Seymour, D.A., 1987. The effect of catalase on recovery of heat-injured DNA-repair mutants of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 133, 1601–1610.
- Mols, M., Abee, T., 2011. Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*. *Environ. Microbiol.* 13 (6), 1387–1394.

- Mols, M., Pier, I., Zwietering, M.H., Abee, T., 2009. The impact of oxygen availability on stress survival and radical formation of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* 135 (3), 303–311.
- Mols, M., Ceragioli, M., Abee, T., 2011. Heat stress leads to superoxide formation in *Bacillus cereus* detected using the fluorescent probe MitoSOX. *Int. J. Food Microbiol.* 151 (1), 119–122.
- Nguyen, H.T., Corry, J.E., Miles, C.A., 2006. Heat resistance and mechanism of heat inactivation in thermophilic campylobacters. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (1), 908–913.
- Patsoukis, N., Papapostolou, I., Georgiou, C.D., 2005. Interference of non-specific peroxidases in the fluorescence detection of superoxide radical by hydroethidine oxidation: a new assay for H₂O₂. *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (5), 1065–1072.
- Sagarzazu, N., Cebrián, G., Pagán, R., Condón, S., Mañas, P., 2010. Resistance of *Campylobacter jejuni* to heat and to pulsed electric fields. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* 11 (2), 283–289.
- Santo, C.E., Taudte, N., Nies, D.H., Grass, G., 2008. Contribution of copper ion resistance to survival of *Escherichia coli* on metallic copper surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (4), 977–986.
- Smirnova, G.V., Oktyabrsky, O.N., 2005. Glutathione in bacteria. *Biochem. Mosc.* 70 (11), 1199–1211.
- Stanier, R.Y., Ingraham, J.L., Wheelis, M.L., Painter, P.R., 1992. *Microbiología*. 2nd ed. Ed. Reverté S.A, Barcelona.
- Stephens, P.J., Druggan, P., Nebe-von Caron, G., 2000. Stressed *Salmonella* are exposed to reactive oxygen species from two independent sources during recovery in conventional culture media. *Int. J. Food Microbiol.* 60, 269–285.
- Storz, G., Zheng, M., 2000. Oxidative stress. In: Storz, G., Hengge-Aronis, R. (Eds.), *Bacterial Stress Responses*. Washington D.C, AMS Press, pp. 47–59.
- Suh, J.H., Knabel, S.J., 2000. Comparison of different reducing agents for enhanced detection of heat-injured *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 63 (8), 1058–1063.
- Wang, X., Zhao, X., Malik, M., Drlica, K., 2010. Contribution of reactive oxygen species to pathways of quinolone-mediated bacterial cell death. *J. Antimicrob. Chemother.* 65 (3), 520–524.
- Whiteman, M., Halliwell, B., 1997. Thiourea and dimethylthiourea inhibit peroxynitrite dependent damage: nonspecificity as hydroxyl radical scavengers. *Free Radic. Biol. Med.* 22 (7), 1309–1312.
- Wisselink, H.W., Weusthuis, R.A., Eggink, G., Hugenholtz, J., Grobbee, G.J., 2002. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *Int. Dairy J.* 12 (2–3), 151–161.
- Wuytack, E.Y., Phuong, L., Aertsen, A., Reyns, K.M.F., Marquenie, D., De Ketelaere, B., Masschalck, B., Van Opstal, I., Diels, A.M.J., Michiels, C.W., 2003. Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by heat and by different nonthermal treatments. *J. Food Prot.* 66 (1), 31–37.
- Yang, Y.T., Bennett, G.N., San, K.Y., 2001. The effects of feed and intracellular pyruvate levels on the redistribution of metabolic fluxes in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 3 (2), 115–123.

Exposure to oxygen and bacterial survival to heat treatments

ABSTRACT

Thermal treatments are currently the main technology used by the food industry to obtain stable and safe products. Environmental factors can widely influence bacterial survival to thermal processes, and the involvement of an oxidative component in bacterial growth and survival is currently gaining attention. The aim of this study was to obtain a global view of the influence of the presence of oxygen on the thermoresistance of microorganisms with different metabolism, in order to evaluate the possible role of an oxidative component on bacterial inactivation. For this purpose, *E. coli* and *L. plantarum* were grown, treated and recovered in presence or absence of oxygen. Cell survival and presence of ROS within the cells was evaluated. Results showed a higher inactivation and ROS presence after treating cells grown and heated in presence of oxygen. Cells in the exponential phase of growth were more sensitive to heat and presented higher ROS levels than cells in the stationary phase. Furthermore cells with fermentative metabolism, *L. plantarum*, showed lower levels of ROS than cells with aerobic respiration, *E. coli*. Besides, lower redox potential plus anaerobic conditions allowed *E. coli* cells a better recovery. Therefore, these results support the view of the importance of the oxidative component in treated cells, factor which should be taken into account for food industry to increase the efficacy of preservation methods.

INTRODUCTION

Thermal treatments are commonly used by the food industry to inactivate spoilage and pathogenic microorganisms, and therefore guarantee stability and safety of different products. Changes in food processing technologies are constantly being introduced, for instance, there is an increasing trend to diminish the intensity of the thermal treatments, and to use additional preservation barriers with the aim of maintaining food properties without lowering microbiological quality. Despite the wide use of heat treatments, and the scientific advances made in the last decades, some aspects such as the actual cause leading to cell inactivation, and the physiological and environmental factors determining bacterial inactivation and survival to thermal processes are not fully characterized (Cebrián *et al.*, 2017). A deeper knowledge of basic scientific aspects would permit a better profit of heat treatments and their combination with other technologies.

To this regard, an environmental factor that is gaining attention in the last years is the possible involvement of an oxidative component in bacterial growth and survival (Stephens *et al.*, 2000; De Spiegeleer *et al.*, 2004; Mols *et al.*, 2009; Mols and Abee, 2011). It has been demonstrated that oxidative stress occurs within bacterial cells when they are exposed not only to direct oxidant agents, such as many disinfection compounds, but also to agents which do not act through a direct redox mechanism, such as heat, high hydrostatic pressure, acids or essential oils, among others (Bromberg *et al.*, 1998; Aertsen *et al.*, 2005; Mols and Abee, 2011; Chueca *et al.*, 2014; Kimura *et al.*, 2017). In the particular case of heat treatments, the relevance of the oxidative balance maintenance on cell survival and/or inactivation seems particularly relevant and it has been demonstrated through different experimental approaches.

For instance, it has been shown that bacterial cells display a higher thermotolerance when they are heated in a low redox potential environment (George and Peck, 1998). Some authors have demonstrated that mutant strains deficient in genes related to oxidative homeostasis maintenance or DNA-repair enzymes are more sensitive to heat (Mackey and Seymour, 1987; Benov and Fridovich, 1995). Besides, recently it has been directly shown that heat treatments induce increased levels of Reactive Oxygen Species (ROS) in cells (Baatout *et al.*, 2005; Mols *et al.*, 2009; Arku *et al.*, 2011; Mols *et al.*, 2011). The levels of detected ROS augmented with the intensity of the treatment applied (Marcén *et al.*, 2017). The actual source of the increase in ROS levels is not known, although some researchers have suggested that they may partly arise from disturbances in the electron transport chain in actively respiring cells (Farr and Kogoma, 1991; Imlay, 2003; Lushchak, 2014).

Also, the occurrence of injured cells after heat treatments which show an increased sensitivity to oxidative conditions has been reported (Bromberg *et al.*, 1998; George *et al.*, 1998). It is generally assumed that heated cells show a better survival capacity when they are recovered under anaerobic conditions, however this depends on the strain investigated (Cebrián *et al.*, 2008). The oxidative component seems to have importance also in bacterial growth and in the ulterior physiological properties of cells. De Spiegeleer *et al.* (2004) demonstrated that subtle differences in growth media composition affected *E. coli* stress resistance, and they attributed this effect to a different level of intracytoplasmic oxidative stress. Mols *et al.* (2009) demonstrated that the oxygen availability during growth affected ulterior stress resistance and ROS detection after heat treatments.

In summary, many lines of evidence indicate that the oxidative component is an important factor affecting bacterial survival to thermal treatments, and subtle differences in growth, treatment and recovery conditions seem to affect bacterial behavior.

However, this is an aspect that has been often underestimated and little appreciated (Mackey, 2000). This work was aimed to offer a global view of the influence of the presence of oxygen and/or the redox potential during growth, treatment and recovery on bacterial survival to heat treatments. The physiological basis of the behavior observed was studied through the determination of ROS levels in treated cells, and through the comparison of cells with different characteristics: stationary *vs* exponential *E. coli* cells; *E. coli* cells (aerobic respiration metabolism) *vs* *L. plantarum* (fermentative metabolism).

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. *Escherichia coli* BW25113 and *Lactobacillus plantarum* CECT 748 were used in this study. The strains were stored at -80°C. To prepare precultures, flasks containing 10 ml of sterile broth were inoculated with one single colony from an agar plate. The precultures were incubated overnight at 37°C, under agitation. Subsequently, cultures were obtained by inoculating a flask with 50 ml of broth with 100 µL of the preculture, and incubation at 37°C under agitation, until stationary phase of growth was reached after 18-24 hours incubation (2×10^9 cfu/ml, approximately). For exponentially growing *E. coli* cells, growth was stopped after 2.5 hours incubation (2×10^8 cfu/ml, approximately). Media used were TSBYE and TSAYE (Tryptic Soy Broth or Agar, respectively, with 0.6% Yeast Extract, Oxoid, Basingstoke, UK) for *E. coli* and MRS (Mann Rogosa Sharpe) broth and agar (Oxoid) for *L. plantarum*. Cell suspensions were obtained either under aerobic or anaerobic atmosphere, as indicated in the text. For anaerobic conditions, a variable atmosphere incubator (MACS VA500, Don Whitley Scientific Limited, Shipley, United Kingdom), with a gas composition of 0% oxygen, 5% hydrogen, 5% carbon dioxide and 90% nitrogen, plus the palladium catalyzer, was used. All liquid and solid media were introduced in the chamber 24 hour prior use. The actual composition of the atmosphere was checked by the use of a specific instrument (Oxybaby M+, WITT-Gasetechnik, Witten, Germany), which revealed oxygen concentrations within the cabinet between 0.0 and 0.2%. Redox potential of media was measured with a redox potential probe (pH- ORP, PH-303, Showrange, Shanghai, China) previously calibrated with a standard solution of 230 mV (Aqua Medic, Bissendorf, Germany).

Heat treatments. Heat resistance experiments were carried out in a thermostation instrument that basically consists of an aluminum thermoblock, able to hold up to 96 1.2 mL plastic tubes for thermostation. The desired temperature is set and controlled by an electronic module. 900 µL of treatment medium, PBS, were pre-warmed in a plastic tube, and 100 µL of the bacterial suspension was inoculated in the liquid and thoroughly mixed. After the desired treatment time, the tube was withdrawn and immediately cooled for further analysis. Treatment temperature used was 58°C, and times ranged from 1.5 to 10 minutes depending on the microorganism and physiological state. For anaerobic treatments, special care was observed in order to minimize oxygen exposure along all the different steps. The thermostation instrument was introduced in the anaerobic cabinet, where all the experimental manipulations were performed, including dilution and plating, fluorescence staining and preparation of samples for microscopy and/or flow cytometry.

Recovery after heat treatment. After heat treatment, samples were serially diluted, plated in agar, and incubated at 37°C. For *E. coli* two recovery agars were used, a complex medium (TSAYE, aerobic and anaerobic conditions) and a minimal medium (MM-Cys, anaerobic conditions) (Marcén *et al.*, 2017). MM-Cys consists in a minimal medium M9 glucose-salts agar supplemented with FeSO₄ (10 mg/L) (Gerhardt, 1994; Stanier and Villanueva, 1996), and enriched with 3 mM L-cysteine HCl to create a low redox potential environment (Gerhardt, 1994; Suh and Knabel, 2000). This medium, plus anaerobic conditions, was chosen to improve the recovery of heated cells (Marcén *et al.*, 2017). For *L. plantarum* MRS-agar under aerobic and anaerobic conditions were used. This microorganism was unable to grow in MM-Cys, probably due to its higher nutritional requirements, as compared to *E. coli*. Depending on the recovery conditions and microorganism, 24 to 72 hours were allowed for full colony development.

Plates were counted after incubation, and results were expressed as the fraction of inactivated cells (Log cycles of inactivation) after a fixed treatment time.

Fluorescence staining. To detect the presence of ROS, cells were stained with dihydroethidium (DHE). DHE is a membrane-permeable probe that binds to DNA upon oxidation by ROS rendering a strong red fluorescence (Gomes *et al.*, 2005). This dye is commonly used for superoxide detection, although it has been shown that DHE is not completely specific to radical superoxide as it can be oxidized by other radicals (Zielonka and Kalyanaraman, 2010). Treated cells were centrifuged, resuspended in PBS to a concentration of 10^8 or 10^6 cfu/mL and incubated with DHE, 50 µM for 90 minutes, as previously determined (Marcén *et al.*, 2017). Previously to carry out the experiments it was checked that these conditions were adequate for all the cell types used in this study. A positive and a negative control of staining were always included. The negative control corresponded to untreated cells, whereas the positive control consisted of cells exposed to the superoxide-generating agent plumbagin (Sigma Aldrich) (5.3 mM/10 min) (Hassan and Fridovich, 1979; Farr *et al.*, 1985). Samples were examined either under an epifluorescence microscopy (10^8 cfu/mL concentration) or through flow cytometry (10^6 cfu/mL concentration). For microscopy, a Nikon Eclipse E400 phase contrast and fluorescence microscope (Nikon Corporation, Japan) was used. Images were obtained with a high resolution camera (AxioCam MRc, Zeiss, Germany) and processed with the software ZEN 2012 (Zeiss, Germany). Total and fluorescent cells were counted from photographs taken from each sample, and at least three different representative microscopic fields, containing 100-200 cells, approximately, were used for quantification. Flow cytometry analysis was performed with a Guava EasyCyte cytometer (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) provided with a 488 nm laser. Samples were introduced into the cytometer at 0.59 µL/s. The threshold was set with the forward scatter (FSC) to 4 mV, to distinguish the cells from the debris and electronic noise, and the values for the photomultiplier tube were 8 (FSC), 19.9 (SSC) and 29.3 (RED). A band-pass filter of 695 nm was used to collect the red fluorescence. Data were obtained (5.000 events) and analyzed using the Software GuavaSoft 2.7 (Millipore, Darmstadt, Germany). Results were expressed using dot plots, representing the fluorescence in red *vs* the side scatter in logarithmic scale, or using histograms, which represent the distribution of the red fluorescence level among the cells in the population (number of events *vs* level of fluorescence). The area under the curve in the histogram was used as a total fluorescence measurement, and was calculated with the Excel software (Microsoft Office 2007).

Statistical analysis. The experimental determinations were performed at least in duplicate with independent microbial cultures. Data in figure correspond to the average and the mean standard deviation (error bars). Student's t tests were carried out using the GraphPad PRISM 5 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA), and differences were considered significant for $p \leq 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Influence of atmosphere composition on *E. coli* heat resistance

E. coli stationary phase cells were subjected to a fixed heat treatment in PBS (58°C/5 min). Cells were grown and treated in aerobic (AE) and in anaerobic (AN) conditions, and then recovered either in TSAYE in aerobiosis, TSAYE anaerobiosis or MM-cys anaerobiosis. The inactivation attained under each of the experimental conditions is represented in Figure 1A. Various observations can be drawn from data in the figure. Firstly, when treated under identical experimental conditions, cells grown under aerobic conditions were more rapidly inactivated by heat than cells grown under anaerobic conditions ($p < 0.05$). Secondly, heat treatment under aerobic atmosphere caused a higher degree of inactivation than under anaerobic atmosphere ($p < 0.05$). On the contrary, the presence of oxygen did not influence cell recovery in complex medium, TSAYE, since the number of survivors was equivalent in aerobic and in anaerobic conditions ($p > 0.05$). However, recovery in MM-cys-anaerobiosis favored cell recovery under all the experimental conditions tested. Experiments were also performed with a longer treatment time (10 min, Fig 1B) and similar conclusions could be drawn.

The results in Figure 1 indicate that the presence of oxygen either during growth or heating would sensitize cells against the lethal action of heat, supporting the hypothesis of an oxidative component playing a role in cell inactivation and/or survival. The effect of the atmosphere composition on cell recovery seems more complex. According to our results, anaerobic atmosphere would not *per se* modify bacterial survival after heating, but it would rather be a combination of atmosphere plus medium composition and/or low redox potential. The protective effect of minimal medium on injured cells has been reported elsewhere (Mackey and Seymour, 1987; Mackey, 2000; Marcén *et al.*, 2017), and it has been attributed to the absence of traces of hydrogen peroxide and other ROS generated during autoclaving. Also, mM quantities of cysteine are commonly added to anaerobic media to quench oxygen and lower redox potential (Barford, 2004; Aertsen *et al.*, 2005; Smirnova and Oktyabrsky, 2005). Measured redox potentials of TSAYE in aerobic and anaerobic conditions, and MM-cys under anaerobic conditions were 170, -159 and -501 mV, respectively. Therefore the low redox potential could be one of the factors contributing to the protective effect observed in MM-cys, but not the only one, since no differences in survival were observed between recovery in TSAYE under aerobic and anaerobic atmosphere.

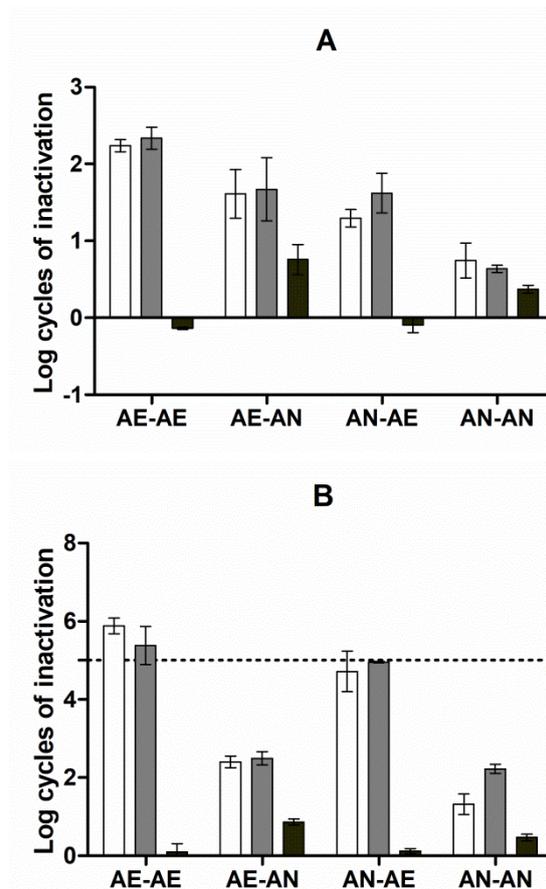


Figure 1. Log₁₀ cycles of inactivation of *E. coli* BW25113 grown to stationary phase, treated at 58°C 5 min (A) and 10 min (B) and recovered in TSAYE aerobiosis (white bars), TSAYE anaerobiosis (grey bars) and minimal medium with 3 mM cysteine added anaerobiosis (black bars). Cells were grown and treated either under aerobic (AE) or anaerobic (AN) conditions (Growth conditions-treatment conditions).

In order to gain insight into the possible link between cell survival and oxidative stress, treated cells were stained with DHE.

Figure 2 shows the percentage of the population of stationary phase *E. coli* showing a positive staining to DHE, estimated through epifluorescence microscopy. As it can be seen in Fig 2, the percentage of stained cells increased with treatment time, as previously described (Marcén *et al.*, 2017). In Fig 2 it can also be observed that the highest proportion of staining corresponded to cells grown and treated under aerobic conditions, whereas the lowest staining percentage was that of cells grown and treated in anaerobiosis. In fact, it seemed that the presence of oxygen during the heat treatment was more important than the presence of oxygen during growth, with regards to the increased level of reactive oxidative species after heating (Fig 2).

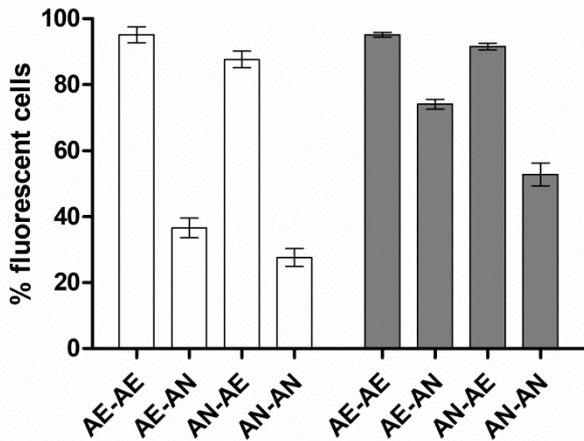


Figure 2. Percentage of cells of *E. coli* BW25113 grown to stationary phase stained with DHE after heat treatment (58 °C) 5 min (white bars) and 10 min (grey bars). Cells were grown and treated either under aerobic (AE) or anaerobic (AN) conditions (Growth conditions-treatment conditions).

Influence of physiological state on *E. coli* heat resistance under aerobic and anaerobic conditions

The appearance of increased levels of reactive oxidative species in cells subjected to environmental stresses can be associated to different cellular events. Some authors have suggested that ROS originate from a damaged membrane, and thus an incorrectly working electron transfer chain. According to this hypothesis, cells with a higher rate of aerobic respiration, i.e. exponentially growing cells under aerobic conditions, should present higher levels of ROS after heating. To study this aspect, *E. coli* cells in the exponential phase were grown in TSBYE under aerobic and anaerobic atmosphere, and heat treated under aerobic and anaerobic conditions. These experimental conditions were chosen since they were the most diverse, in terms of survival and ROS appearance, for stationary phase cells (Fig 1 and 2). Percentage of DHE-stained cells after treatments were also determined. Results are included in Fig 3 and 4.

As expected, cells in the exponential phase were more sensitive to heat as compared to cells in the stationary phase, and therefore a less intense treatment was applied (1.5 min and 3.0 min at 58°C, Fig 3) to obtain similar lethality. In this case, also cells grown and treated in absence of oxygen survived better the heat treatment applied ($p < 0.05$). With regards to recovery, also in this case the atmosphere exerted no effect on recovery in complex media ($p < 0.05$). On the contrary, and similarly to that observed for stationary phase cells, recovery in MM-cys-anaerobiosis protected cells against inactivation in a notable magnitude (Fig 3).

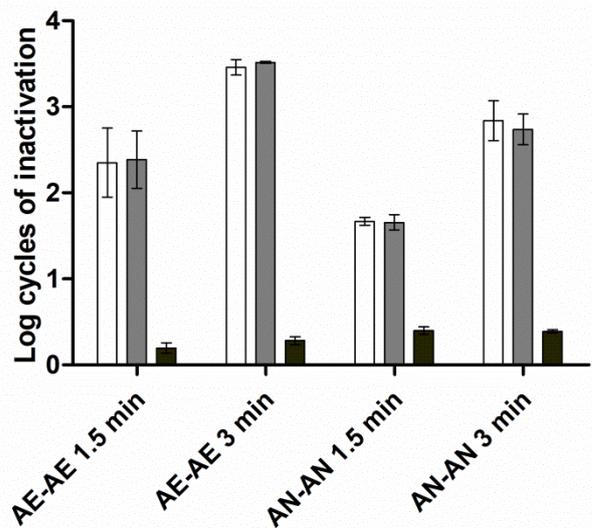


Figure 3. Log₁₀ cycles of inactivation of *E. coli* BW25113 grown to exponential phase, treated at 58°C 1.5 and 3 min and recovered in TSAYE aerobiciosis (white bars), TSAYE anaerobiosis (grey bars) and minimal medium with 3 mM cysteine added anaerobiosis (black bars). Cells were grown and treated either under aerobic (AE) or anaerobic (AN) conditions (Growth conditions-treatment conditions).

We observed that, similarly to stationary phase cells, the percentage of DHE-stained cells was higher in cells grown and treated in the presence of oxygen, although the percentage of exponentially DHE-stained cells appeared to be slightly lower than that of stationary phase cells (data not shown); however the microscopic observation clearly revealed that exponential phase cells presented a more intense staining. For this reason flow cytometry measures were also performed in selected samples, in order to establish a meaningful comparison with stationary phase cells.

Figure 4 shows typical flow cytometry dot plots (side scatter vs fluorescence in red) and histograms (fluorescence in red) obtained from DHE-stained heat treated stationary phase cells. In this figure samples shown correspond to native (nontreated) cells grown aerobically (4A), cells grown and treated under aerobic atmosphere (4B) and cells grown and treated under anaerobic atmosphere (4C). Superimposed histograms corresponding to the three samples are shown in Figure 4D, where they can be compared.

As it can be seen, cells grown and treated in the presence of oxygen presented a higher staining degree, which is illustrated as a displacement of the dot plot and the histogram towards higher values of fluorescence in red, which can be compared quantitatively. Area under the curve and maximum fluorescence intensity were calculated and are included in Table 1. Results in the table correspond to the average of two independent replicates, including 5000 evens each. The two replicates showed a very similar cytometry pattern (data not shown).

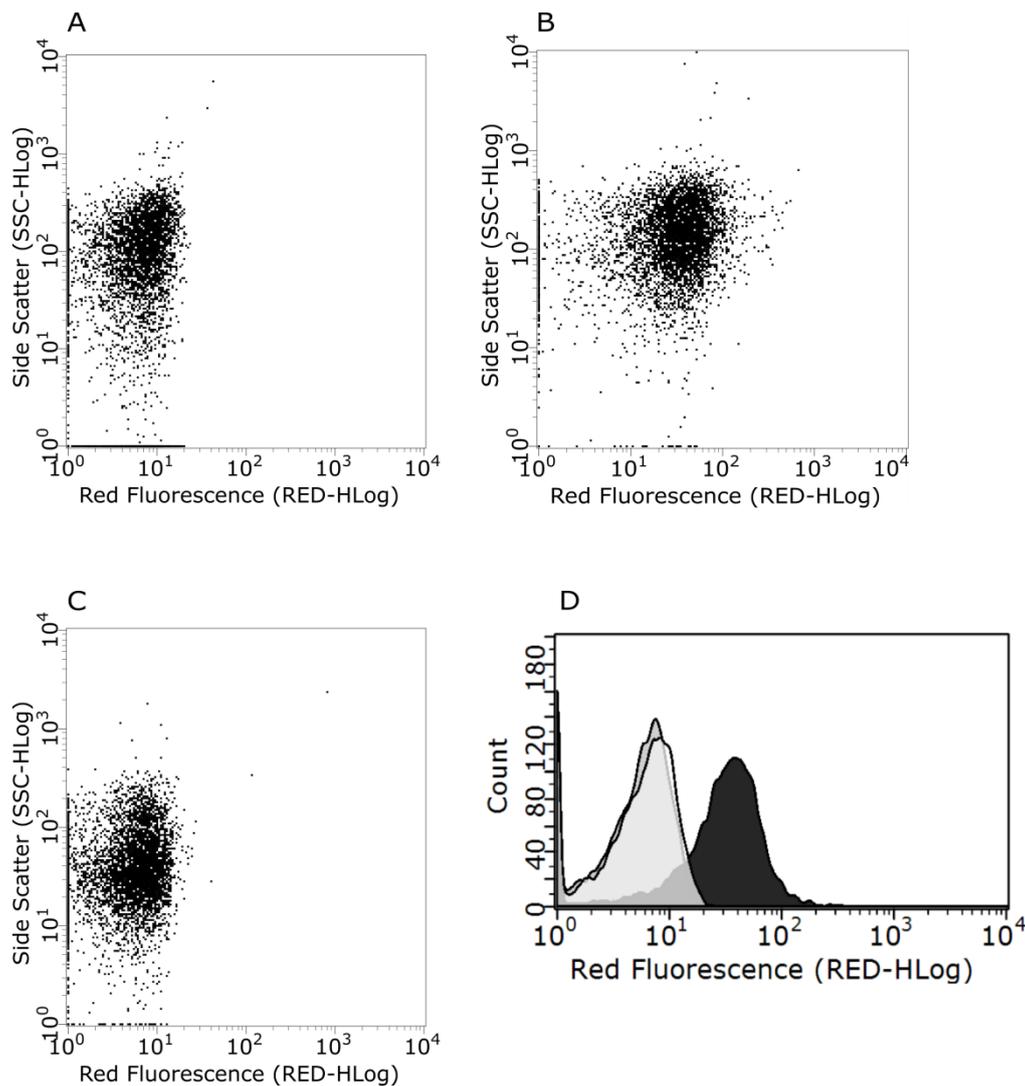


Figure 4. Flow cytometry dot plots of nontreated cells grown under aerobic atmosphere (A), cells grown and treated under aerobic atmosphere (B) and cells grown and treated under anaerobic atmosphere (C) and superimposed histograms (D) corresponding to A (white peak), B (black peak) and C (grey peak).

Data included in the table confirmed quantitatively that exponential phase cells were more intensely stained after treatment than stationary phase cells, fact that could be due to the higher rate of active respiratory metabolism in the former. Besides, they also confirm that heat treatment under anaerobic conditions of cells grown under anaerobiosis induced no important increases in reactive oxidative species levels inside cells, neither for stationary nor for exponential phase cells.

These results support the view that the increase in ROS levels in a prokaryotic cell could be directly related to active respiration. This fact could contribute to the higher heat sensitivity normally shown by exponentially growing cells. However it has to be noted that, according to figure 2, the most important factor leading to increased reactive oxidative species level after the treatment was the presence of oxygen during heating and not during growth. Therefore, other oxygen-dependent reactions taking place during

heating, not related to the aerobic respiration used by the microorganisms during growth, were taking place.

Influence of aerobic and anaerobic conditions on *L. plantarum* heat resistance and reactive oxidative species levels.

In order to clarify the role of the respiratory metabolism on ROS levels and survival to heat, we used *L. plantarum* as a model anaerobic aerotolerant organism. Cells were grown in MRS, and heat treated at 58°C for 6 and 10 minutes. Survival results are shown in figure 6, and flow cytometry data corresponding to DHE staining, in Table 1. It has to be noted that MM-cys did not support growth of this microorganism, therefore these data are absent.

Results in Fig. 5 showed that differences were of small magnitude among the different treatment conditions.

Table 1. Maximum fluorescence intensity (MFI) and total fluorescence (A_t) before and after treating (58°C) *E. coli* BW25113 stationary phase (5 min), *E. coli* exponential phase (1.5 min) and *L. plantarum* CECT 748 cells (6 min). Cells were grown and treated either under aerobic (AE) or anaerobic (AN) conditions (growth conditions-treatment conditions).

	<i>E. coli</i> STAT		<i>E. coli</i> EXP		<i>L. plantarum</i>	
	MFI	A_t	MFI	A_t	MFI	A_t
Native cells AE	8,01	3546	9,1	3653	6,5	2955
Native cells AN	8,2	3552	11	3877	6,8	3333
AE-AE	39,3	6964	67,1	8048	10,6	4346
AE-AN	20,8	5700	ND	ND	ND	ND
AN-AN	7,4	3415	10,5	4194	8,1	3632

Recovery under aerobic or anaerobic conditions did not influence the number of survivors obtained when cells were grown and treated under aerobic conditions, but it did when cells had been grown and treated under anaerobic conditions, in such a way that survival was worsened under aerobic recovery. This effect was particularly notable for the longer treatment time. It is reasonable to think that an abrupt change from oxygen absence to presence would represent an additional stress for heated *L. plantarum* cells, preventing the recovery of a great percentage of the surviving population.

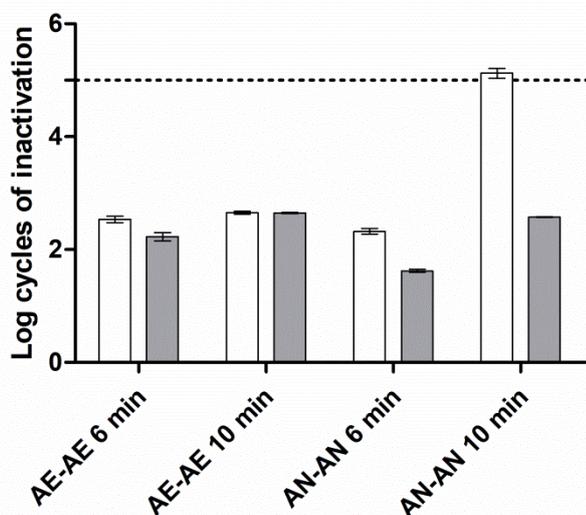


Figure 5. Log₁₀ cycles of inactivation of *L. plantarum* CECT 748 treated at 58°C 6 and 10 min and recovered in MRS agar aerobiosis (white bars) and MRS agar anaerobiosis (grey bars). Cells were grown and treated either aerobic (AE) or anaerobic (AN) conditions (Growth conditions-treatment conditions).

Actually, cytometry examination confirmed that *L. plantarum* cells acquired a very low staining intensity with DHE, as compared to *E. coli* either in stationary or in exponential phase (Table 1). However, a certain increase in fluorescence was still detected for cells grown and treated in the presence of oxygen.

All these results suggest that the presence of an aerobic respiration metabolism and the exposure to oxygen during heating are factors that both provoke an increase in reactive oxidative species levels inside the cells, probably in an independent manner, at least to some extent. In fact, it has been reported that accidental autooxidation of flavoproteins, related or not to the respiratory metabolism, is an important source of superoxide and hydrogen peroxide in untreated cells, which would be, according to some authors, more important than ROS originating in the electron transport chain (Seaver and Imlay, 2004; Imlay, 2013).

The reason behind the appearance of DHE-staining in *L. plantarum* is unknown. Some authors have described that given strains of this species can use a so called- minimal electron transport chain, using oxygen as the final electron acceptor under particular growth conditions (Watanabe *et al.*, 2012). In this case, respiratory metabolism would be used and ROS could therefore be formed in these cells. Nevertheless, it is also possible that ROS are formed from autoxidizable enzymes, upon contact with oxygen, for instance fumarate reductase, which is also present in *L. plantarum* (Kleerebezem *et al.*, 2003).

Taken all together, results in this investigation have shown that bacterial resistance to heat is influenced by oxygen exposure during grow and heating, as it is the appearance of radicals. However the influence of oxygen exposure seemed to depend on the microorganism studied, and on the metabolism used for growth. ROS-staining appeared in all types of cells, whatever the metabolism used for growth, when they were heated in the presence of oxygen. Therefore, increased level of ROS appeared to be correlated to exposure to oxygen during heating. In *E. coli* stationary phase cells, we have also demonstrated that higher levels of ROS were present in cells grown under aerobic conditions. Exponential phase cells showed a higher degree of oxidative unbalance after heating, since higher levels of ROS-staining were detected in these cells, as compared to stationary phase cells. However, in all *E. coli* cells, independently of the growth and treatment conditions,

and on the ROS level detected after treatment, recovery under conditions that can be considered as oxidative-gentle, i.e. minimal medium-cys-anaerobiosis, with a low redox potential, greatly improved cell survival. This fact is particularly important since it supports the view of the importance of the oxidative component in treated cells. Besides, from a practical point of view, these results indicate that most commonly used laboratory recovery methods could be underestimating the number of survivors to technological treatments, in this case, to heat. In addition, oxygen availability during the different steps in food processing should be a factor to take into account when the efficacy of preservation methods is evaluated.

Acknowledgments

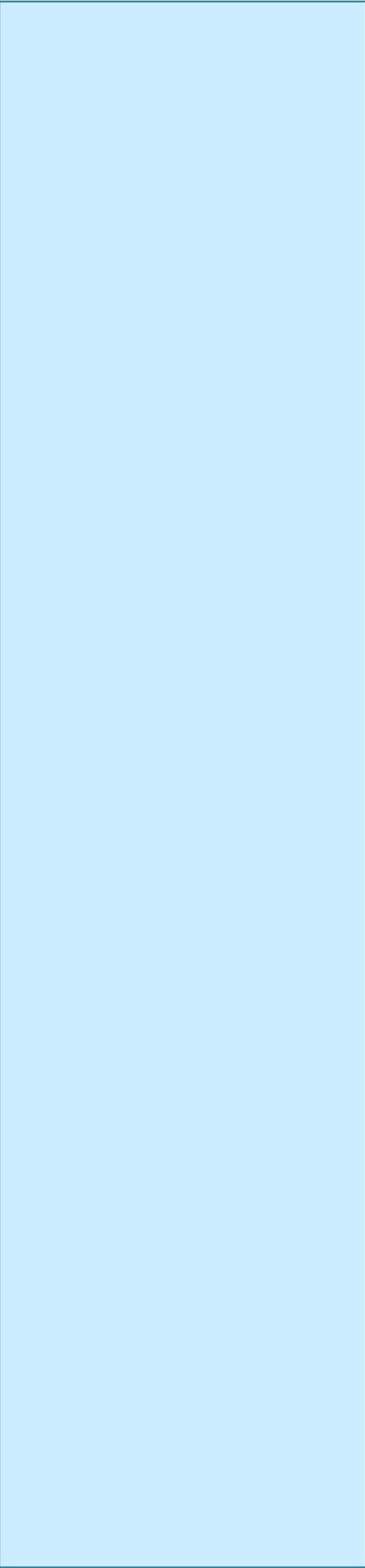
The authors would like to thank the European Regional Development Fund, MINECO-CICYT (projects AGL2012-33522; AGL2015-69565-P) and the Department of Innovation Research and University of the Aragón Government and European Social Fund (FSE) for the support (predoctoral grant M. Marcén, C093/2014)

REFERENCES

- Aertsen, A., De Spiegeleer, P., Vanoirbeek, K., Lavilla, M., Michiels, C.W., 2005. Induction of oxidative stress by high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2226-2231.
- Arku, B., Fanning, S., Jordan, K., 2011. Flow cytometry to assess biochemical pathways in heat-stressed *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*). *Journal of Applied Microbiology* 111, 616-624.
- Baatout, S., De Boever, P., Mergeay, M., 2005. Temperature-induced changes in bacterial physiology as determined by flow cytometry. *Ann Microbiol* 55, 73-80.
- Barford, D., 2004. The role of cysteine residues as redox-sensitive regulatory switches. *Current opinion in structural biology* 14, 679-686.
- Benov, L., Fridovich, I., 1995. Superoxide dismutase protects against aerobic heat shock in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 177, 3344-3346.
- Bromberg, R., George, S., Peck, M., 1998. Oxygen sensitivity of heated cells of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology* 85, 231-237.
- 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, 107.
- Cebrián, G., Sagarzazu, N., Pagán, R., Condón, S., Mañas, P., 2008. Resistance of *Escherichia coli* grown at different temperatures to various environmental stresses. *Journal of Applied Microbiology* 105, 271-278.
- Chueca, B., Pagán, R., García-Gonzalo, D., 2014. Differential mechanism of *Escherichia coli* inactivation by (+)-limonene as a function of cell physiological state and drug's concentration *PLoS One* 9 (4), e94072.
- De Spiegeleer, P., Sermon, J., Lietaert, A., Aertsen, A., Michiels, C., 2004. Source of tryptone in growth medium affects oxidative stress resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology* 97, 124-133.
- Farr, S.B., Kogoma, T., 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiological reviews* 55, 561-585.
- Farr, S.B., Natvig, D.O., Kogoma, T., 1985. Toxicity and mutagenicity of plumbagin and the induction of a possible new DNA repair pathway in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 164, 1309-1316.
- George, S., Peck, M., 1998. Redox potential affects the measured heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 independently of oxygen concentration. *Letters in applied Microbiology* 27, 313-317.
- George, S., Richardson, L., Pol, I., Peck, M., 1998. Effect of oxygen concentration and redox potential on recovery of sublethally heat-damaged cells of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology* 84, 903-909.
- Gerhardt, P., 1994. *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology.
- Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J.L., 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of biochemical and biophysical methods* 65, 45-80.
- Hassan, H.M., Fridovich, I., 1979. Intracellular production of superoxide radical and of hydrogen peroxide by redox active compounds. *Archives of biochemistry and biophysics* 196, 385-395.
- Imlay, J.A., 2003. Pathways of oxidative damage. *Annual Reviews in Microbiology* 57, 395-418.
- Imlay, J.A., 2013. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nature reviews. Microbiology* 11, 443.
- Kimura, K., Morimatsu, K., Inaoka, T., Yamamoto, K., 2017. Injury and recovery of *Escherichia coli* ATCC25922 cells treated by high hydrostatic pressure at 400-600 MPa. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 123, 698-706.
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O.P., Leer, R., Turchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fiers, M.W., 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 1990-1995.
- Lushchak, V.I., 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions* 224, 164-175.
- Mackey, B., 2000. Injured bacteria, in: Lund, M., Baird-Parker, T. C., Gould, G. W. (Ed.), *The Microbiological Safety and Quality of Food Vol. I*. Springer, pp. 315-341.
- Mackey, B.M., Seymour, D.A., 1987. The effect of catalase on recovery of heat-injured DNA-repair mutants of *Escherichia coli*. *Microbiology* 133, 1601-1610.
- Marcén, M., Ruiz, V., Serrano, M.J., Condón, S., Mañas, P., 2017. Oxidative stress in *E. coli* cells upon exposure to heat treatments. *International Journal of Food Microbiology* 241, 198-205.
- Mols, M., Abee, T., 2011. Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*. *Environmental microbiology* 13, 1387-1394.
- Mols, M., Ceragioli, M., Abee, T., 2011. Heat stress leads to superoxide formation in *Bacillus cereus* detected using the fluorescent probe MitoSOX. *International Journal of Food Microbiology* 151, 119-122.
- Mols, M., Pier, I., Zwietering, M.H., Abee, T., 2009. The impact of oxygen availability on stress survival and radical formation of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology* 135, 303-311.
- Seaver, L.C., Imlay, J.A., 2004. Are respiratory enzymes the primary sources of intracellular hydrogen peroxide? *Journal of Biological Chemistry* 279, 48742-48750.
- Smirnova, G., Oktyabrsky, O., 2005. Glutathione in bacteria. *Biochemistry* 70, 1199-1211.
- Stanier, R.Y., Villanueva, J.R., 1996. *Microbiología*. Reverté.
- Stephens, P., Druggan, P., Nebe-von Caron, G., 2000. Stressed *Salmonella* are exposed to reactive oxygen species from two independent sources during recovery in conventional culture media. *International Journal of Food Microbiology* 60, 269-285.
- Suh, J.-H., Knabel, S.J., 2000. Comparison of different reducing agents for enhanced detection of heat-injured *Listeria monocytogenes*. *Journal of food protection* 63, 1058-1063.
- Watanabe, M., van der Veen, S., Abee, T., 2012. Impact of respiration on resistance of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 to acid stress. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 4062-4064.
- Zielonka, J., Kalyanaram, B., 2010. Hydroethidine-and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: another inconvenient truth. *Free Radical Biology and Medicine*. 48(8), 983-1001.

4.3 Influencia del estrés oxidativo en las diversas tecnologías

- **Manuscrito III: Celular events involved in *E. coli* cells inactivation by several technologies for food preservation: a comparative study.**



Cellular events involved in *E. coli* cells inactivation by several technologies for food preservation: a comparative

ABSTRACT

Traditional and novel technologies for food preservation are being investigated to obtain safer products and fulfil consumer demands for less processed foods. These technologies inactivate microorganisms present in foods through their action on different cellular targets, but the final cause of cell loss of viability often remains not well characterized. The main objective of this work was to study and compare cellular events that could play a role on *E. coli* inactivation upon exposure to treatments with technologies of different nature. *E. coli* cells were exposed to heat, high hydrostatic pressure (HHP), pulsed electric fields (PEF) and acid treatments, and the occurrence of several alterations, including presence of sublethal injury, membrane permeabilization, increased levels of reactive oxygen species, DNA damage and protein aggregation were studied. Results reflected differences among the relevance of the several cellular events depending on the agent applied. Sublethally injured cells appeared after all the treatments, cells consistently recovered in a higher degree in non-selective medium, particularly in minimal medium, as compared to selective medium; however this effect was less relevant in PEF-treated cells. A high degree of membrane permeabilization was observed in PEF treated cells, DNA damage appeared as an important target in acid treatment, and massive protein aggregation in HHP treated cells. Increased levels of ROS were detected inside cells after all the treatments, although their order of appearance and relationship with membrane permeabilization varied depending on the technology. Results obtained help to understand the mode of action of food preservation technologies on bacterial cells.

INTRODUCTION

Food preservation is a continuous fight against pathogenic and spoilage microorganisms in order to obtain safe products. However, consumers not only expect safe products, but also demand products which keep their nutritional and sensorial properties. With the purpose of achieving consumer demands, the food industry investigates novel technologies for food preservation. Some of the most investigated technologies are non-thermal technologies such as high hydrostatic pressure (HHP) and pulsed electric fields (PEF). Besides, optimization of traditional techniques such as heat treatments, acidity, natural antimicrobials, packaging systems, etc., continues to be an important research topic. To obtain a better profit of all these technologies and to design appropriate combined processes, it is necessary to gain deeper insight into their mode of action on microorganism.

Within a bacterial cell, there are many potential cellular targets that may be affected by a given stressing agent; some of them are considered as critical targets, whereas others are not essential for bacterial survival (Mackey and Mañas, 2008; Miles, 2006). In addition, there are tight interrelationships between the various structures and cellular functions; therefore, the alteration of a particular structure or function may indirectly affect another one. Furthermore, the degree of damage exerted to the different cellular targets is also an important factor, since damages in critical components at low intensity may produce sublethal injury; similarly, damages in non-critical components may also render sublethally injured cells. These cells can repair their damages and resume

growth only if the environmental conditions are appropriate (Mackey, 2000). In summary, identifying the particular structures and processes whose alteration leads to cell death remains a difficult task.

Nowadays, it is generally accepted that heat treatment has a multi-target mode of action on microorganisms, since it is able to cause alterations at different cellular levels. These include cytoplasmic membrane damage, outer membrane damage, DNA strand breaks, inactivation of enzymes, protein coagulation, etc (Mackey, 2000; Lado and Yourself, 2002). HHP is also considered a multi-target technology, affecting envelopes integrity, DNA and protein conformation, ribosomes configuration etc. (Mackey and Mañas, 2008; San Martin *et al.*, 2002, Aertsen *et al.*, 2005). Studies about PEF have described that electroporation in the cytoplasmic membrane is the main cellular alteration during exposure to this technology (Mañas and Pagán, 2005). On the other hand, although much less information is available, envelopes, protein and DNA damage are considered as important targets to inactivate microorganisms by acid pH. Organic acids pass passively through the membrane and, inside the cell, produce an internal acidification which affects the transmembrane pH gradient, reduces the activity of some enzymes and damages proteins and DNA (Richard and Foster, 2004; van de Guchte *et al.*, 2002). Despite the different mode of action of the various technologies, the cytoplasmic membrane appears as a common target in most cases.

Currently, a new aspect is gaining importance as a possible common mechanism of microbial inactivation of

all of these technologies: the oxidative component (Mols and Abee, 2011). Reactive oxygen species (ROS) are constantly produced and eliminated in aerobic living cells to maintain certain steady-state level. However, if the balance between ROS production and elimination is altered, an increased ROS level will be produced, causing an unbalance. In this way, it has been proven that higher levels of ROS are detected in heat treated *E. coli* cells (Baatout *et al.*, 2005; Marcén *et al.*, 2017). Besides, Aertsen *et al.* (2005) demonstrated that HHP treatment induces cytoplasmic oxidative stress in *E. coli*. Furthermore, oxidative stress was correlated with HHP resistance considering that some mutant strains, deleterious in some genes associated with ROS elimination, were hypersensitive towards HHP in contrast with the wild type (Malone *et al.*, 2006). Pakhomova *et al.* (2012) suggested that in PEF treatment (nanosecond pulses) the increase in non-selective transmembrane cation conductance may be in part mediated by oxidative stress, and ROS formation could be a factor contributing to the cytotoxic effects in eukaryotic cells. Finally, Mols *et al.* (2010) supported the idea that acid stress also induced oxidative stress and proposed that the formation of radicals such as OH^\cdot may be a common mechanism of cellular death when bacteria are exposed to different stress conditions.

Thus, there are several reports of increased ROS levels in cells treated by a variety of physical and chemical agents. According to some authors, under physiological conditions, ROS production takes place in the order $\text{O}_2^\cdot \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^\cdot$ (superoxide \rightarrow hydrogen peroxide \rightarrow hydroxyl), due to the consecutive addition of one electron to the oxygen molecule (Lushchak, 2011; Imlay, 2003). Increased ROS levels have been attributed to disturbances in the electron transport as a consequence of alterations in cytoplasmic membrane integrity and functionality; however, it is important to bear in mind that the level of ROS within bacterial cells may also increase depending on other factors such as the loss of activity of scavenging enzymes, the loss of antioxidant molecules, or the presence of free iron in the cytoplasm, among other factors (De Spiegeleer *et al.*, 2004; Gusarov and Nudler, 2005; Imlay, 2013).

This research was aimed to clarify whether the increase of oxidative stress level could be a common event involved in the inactivation of bacteria by food preservation technologies of different nature. To reach this objective, the presence of ROS after heat, HHP, PEF and acid treatments was determined, the possible relation with membrane damage was studied and comparisons among the different technologies were made. Moreover, other cellular alterations that could be involved in cell inactivation were also studied in order to gain knowledge about the mode of action of several stressing agents on bacteria.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. *Escherichia coli* BW25113 and its isogenic mutants JW0013 ($\Delta\text{DnaK:kan}$) and, JW2669 ($\Delta\text{RecA:kan}$) were used in this study. The strains were stored at -80°C . To prepare preculture, a flask containing 10 mL of sterile TSBYE (Tryptic Soy Broth with 0.6% Yeast Extract, Oxoid, Basingstoke, UK) was inoculated with one single colony from a TSAYE plate (Tryptic Soy Agar with 0.6 % Yeast Extract, Oxoid). The preculture was incubated overnight at 37°C , under agitation. Subsequently, a culture was obtained by inoculating a flask with 50 mL TSBYE with 100 μL of the preculture, and incubating under agitation at 37°C for 18-24 hours until stationary phase of growth (2×10^9 cells/ mL, approximately).

Heat treatment. Heat treatments were carried out in glass tubes, which contained 4.5 mL of sterile PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma, San Louis, USA) as treatment medium, submerged and prewarmed at 58°C in a thermostated water bath. 0.5 mL of the bacterial culture was inoculated to reach an initial concentration of 10^8 cells/ mL, and after different heating times, samples were collected, immediately cooled and kept for further analysis.

High hydrostatic pressure treatments. Stansted Fluid Power S-FL-085-09-W (Harlow, London, England) equipment was used to carry out HHP treatments. A mixture of propylene glycol and distilled water (50/50, v/v) was used as the pressure transmitting fluid. An automatic device was employed to set and record the pressure, time and temperature during the pressurization cycle. Cell suspensions were centrifuged and diluted to a cell concentration of 10^8 cells/ mL in PBS, approximately. Samples were packed in plastic bags, which were sealed and introduced in the equipment treatment chamber. Treatments were applied at 300 MPa during different treatment times up to 30 minutes, and temperature never exceeded 40°C .

Pulsed electric field treatment. PEF equipment used in this investigation was supplied by ScandiNova (Modulator PG, ScandiNova, Uppsala, Sweden). The equipment and treatment chamber used in this investigation were previously described by Saldaña *et al.* (2010). For PEF treatments, cells were dissolved in McIlvaine buffer (pH 7.0 and 1 mS/cm of conductivity) at a concentration of 10^8 cells/ mL. Samples were introduced in the treatment chamber of the PEF equipment, which had a gap of 0.25 cm. A square pulse with an amplitude of 3 μs , a frequency of 0.5 Hz, electric field strength of 20 kV/cm and $<40^\circ\text{C}$ of temperature were used during the treatment. Under these experimental conditions, the energy per pulse was 1.20 kJ/kg. Treatments of up to 100 pulses (300 μs) were applied.

Acidity treatment. TSBYE was acidified to pH 3.0 with lactic acid and then filter-sterilized. Cells were added to a concentration of 10^8 cells/ mL, and temperature was kept constant at 25°C . 100 μL samples were withdrawn at intervals, up to 120 min, and transferred into 900 μL of TSBYE for neutralization.

Recovery after treatments and survival curves. After each treatment, samples were serially diluted in MRD (Maximum Recovery Diluent, Oxoid) and pour-plated in TSAYE for survival counts. Plates were incubated at 37°C in aerobic conditions and after 24-72 h colony forming units were counted. With the purpose of constructing survival curves, the fraction of survivors ($\text{Log } N_t/N_0$) was represented *vs* the treatment time (minutes for heat, HHP and acid treatments, and μs in PEF treatment). Under most experimental conditions deviations from linearity were observed, and therefore the Geeraerd inactivation model-fitting tool (GInaFIT) (Geeraerd *et al.*, 2005) was used to fit survival curves and to calculate resistance parameters. As survival curves obtained in this investigation generally showed shoulders, the log linear regression plus shoulder model was used in the majority of the experiments (Equation 1). However, in the particular case

of PEF treatments, survival curves showed a linear portion plus a tail, so in this case the log linear regression plus tail was used (Equation 2) (Geeraerd *et al.*, 2000).

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

$$N(t) = (N(0) - N_{res}) \cdot e^{-k_{max} \cdot t} + N_{res} \quad (2)$$

In these equations $N(t)$ represents the number of survivors, $N(0)$ the initial count and t the time for treatments. Furthermore, to describe the survival curves, these two models use the following parameters: shoulder length (S_l), defined as the time before the exponential inactivation begins; inactivation rate (K_{max}), defined as the slope of the exponential portion of the survival curve; and N_{res} which describes the residual population density (tail).

The traditional decimal reduction time value (D) of each survival curve was calculated from K_{max} (Equation 3).

$$D = 2.303/K_{max} \quad (3)$$

To compare the resistance to the different technologies, $2D$ values were calculated. In this case $2D$ is defined as the dose necessary to inactivate 2 Log₁₀-cycles of the initial population, and is calculated by Equation 4.

$$2D = S_l + 2 \times D \quad (4)$$

Where S_l is the shoulder length duration and D is the inactivation parameter calculated from Equation 3.

Where indicated in the text, cells were also recovered in minimal M9 glucose-salts agar enriched with 3 mM L-cysteine HCl (MM-cys) (Sigma Aldrich, Milan, Italy) under anaerobic atmosphere (MACS VA500 Microaerophilic Workstation, DW Scientific, UK). M9 agar was prepared as described previously (Gerhardt *et al.*, 1994), supplemented with FeSO₄ (10 mg/L) to improve bacterial growth (Stanier *et al.*, 1992), and with cysteine to create a low redox potential medium (Gerhardt *et al.*, 1994; Suh and Knabel, 2000). On the other hand, a selective medium which consisted of TSAYE with 4% NaCl (Panreac S.A, Barcelona, Spain), was used to detect the number of sublethally damaged cells (Mackey, 2000). In order to quantify and compare the proportion of sublethally damaged cells appearing after exposing cells to the different technologies, the area under the curve (time units \times Log Nt/N0) was calculated with the GraphPad PRISM 5 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) as described by Lou and Yousef (1997), fixing a treatment time corresponding to 2 Log cycles of inactivation under standard recovery conditions (TSAYE). The population displaying sublethal damage corresponds to the area under the curve of cells recovered in selective medium (TSAYE-NaCl), minus the area under the curve of cells recovered in non-selective one (TSAYE, MM-cys) for a fixed exposure time. Since survival curves to the different technologies were not directly comparable because of their different treatment lengths; the ratio between both areas was calculated, instead of the difference, in order to establish meaningful comparisons.

ROS, membrane permeabilization and protein aggregation determinations. The presence of ROS and membrane permeabilization in cells after exposure to the treatments was studied through staining with specific fluorochromes followed by epifluorescence microscopy. Treated cells were collected and stained separately with DHE (dihydroethidium) (Life Technologies), HPF (hydroxyphenyl fluorescein) (Sigma Aldrich) and PI (propidium iodide) (Sigma Aldrich). In some experiments, where indicated in the text, double staining was performed, by the use of two dyes combined simultaneously. The combinations used were DHE plus HPF, and HPF plus PI. Treated cells were incubated with the fluorescent dye at a cell concentration of approximately 10⁸ cells/ mL, then centrifuged and resuspended in PBS. A positive and a negative control were always included. Staining conditions were 50 μ M/90 minutes for DHE and HPF and 3 μ M/30 min to PI (Marcén *et al.*, 2017; Klotz *et al.*, 2010; Patsoukis *et al.*, 2005;

Mols *et al.*, 2009). The results obtained were analyzed by phase contrast and fluorescence microscopy (Nikon Eclipse E400, Nikon Corporation, Japan), in order to obtain the percentage of stained cells. Images were obtained with a high resolution camera (AxioCam MRc, Zeiss, Germany) and processed with the software ZEN 2012 (Zeiss, Germany). Total and fluorescent cells were counted from photographs taken from each sample, and at least three different representative microscopic fields, containing 100-200 cells, approximately, were used for quantification. Besides, cells were also stained with fluorescein sodium salt (Sigma Aldrich) in order to explore the presence of protein aggregates inside the cytoplasm after the exposure to the different agents. Cells were stained with a final fluorescein concentration of 65 μ M and then incubated in the dark for 10 minutes.

Measurement of DNA damage by qualitative PCR assays. Bacterial DNA damage was measured semi quantitatively following the fundamentals of the method reported by Park and Imlay (2003), based on the fact that damaged DNA renders a less effective amplification with a high fidelity polymerase. Total genomic DNA, either from untreated or from treated cells, was isolated from 1 mL of culture using a genomic DNA extraction kit (Realpure, Real Laboratory, Valencia, Spain). DNA was quantified spectrophotometrically and diluted in MilliQ water to 10 ng/ μ L (Simplinano, Biochrom, Cambridge, UK). A 1860 pb fragment upstream and downstream rpoS gene was used for amplification. Primer sequences were as follows: 5'-ACTGTCAGCAGTACATCAACCAGTA (forward primer) and 5'-GTTACCAGCCGATTATTATTTC (reverse primer). The 20 μ L PCR mixture contained 20 ng of genomic DNA as a template, a 40 μ M concentration (each) of the two primers, 20 mM of the deoxynucleotide mix (Sigma), 5X Phusion HF Buffer and 1 μ L of Phusion DNA Polymerase 2 U/ μ L (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). Thermal cycling was performed with a MultiGene II Personal Thermal Cycler (Labnet Biotecnica, Madrid, Spain). The genomic DNA was initially denatured for 3 min at 98°C, and then the DNA was subjected to 30 cycles of PCR, with 1 cycle consisting of denaturation at 98°C for 10 s and annealing at 66°C for 30 s and extension at 72°C for 90 s. A final extension step at 72°C was performed for 10 min at the completion of the profile. PCR products were separated by 1% agarose gel electrophoresis, stained with SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and photographs were obtained with Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Statistical analysis. All the experimental determinations were performed at least in triplicate with independent microbial cultures, and data in figure correspond to the average and the mean standard deviation (error bars). Student's t tests were carried out using the GraphPad PRISM 5 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA), and differences were considered significant for $p \leq 0.05$.

RESULTS

Survival of *E. coli* to heat, HHP, PEF and acid.

The resistance of *E. coli* cells to different technologies was evaluated. In this way, cells were treated by heat (58°C), HHP (300 MPa), PEF (20 kV/cm), and lactic acid (pH 3.0). Figure 1 shows the survival curves of *E. coli* to the four technologies, obtained in TSAYE, TSAYE-NaCl and MM-Cys. Experimental data were fitted to the Geeraerd equation, and the parameters obtained are included in Table 1. All the survival curves were adequately described by the Geeraerd equations ($R^2 \geq 0.97$), except the curve corresponding to acid treatment and MM-cys as recovery medium, due to the insufficient inactivation attained after the longest exposure time tested. As it can be observed in the graphs, the shape of the survival curves depended on

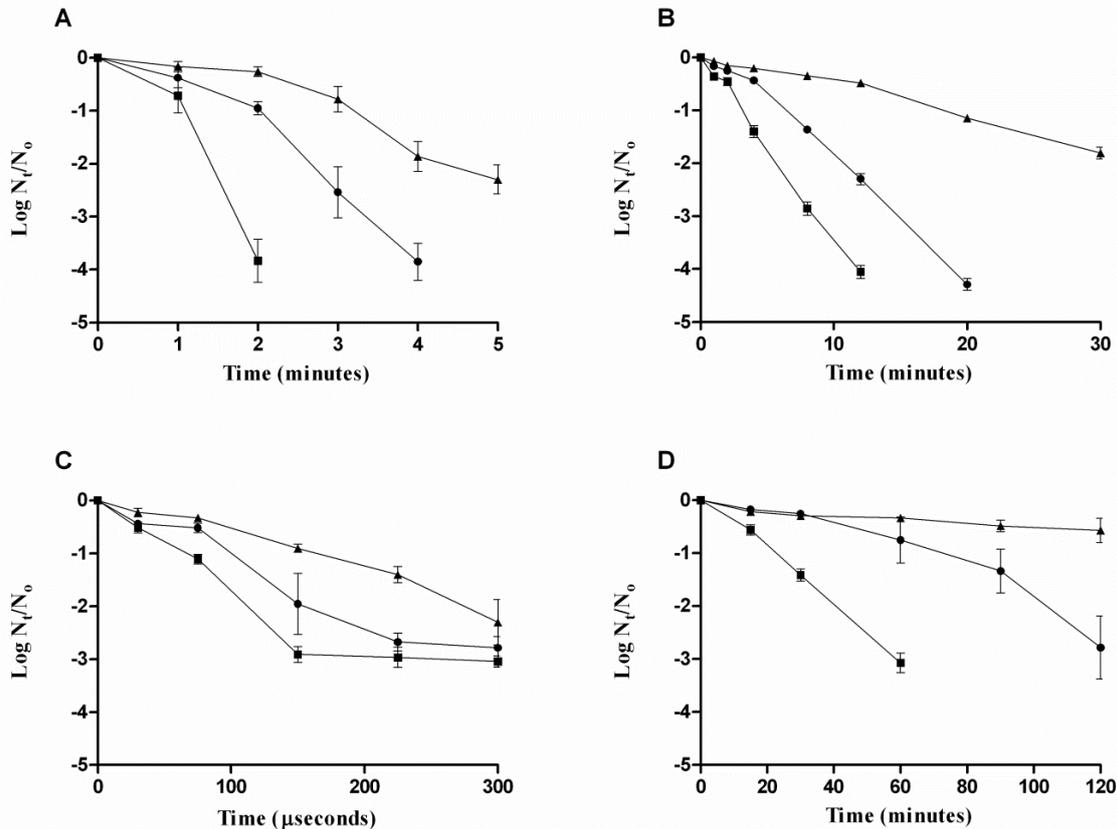


Figure 1. Survival curves of *E. coli* BW25113 obtained in TSAYE (●), TSAYE-NaCl (■) and MM-cys (▲) after treating cells by heat (58°C) (A), HHP (300 MPa) (B), PEF (20 kV/cm) (C) and acidity (pH 3.0) (D).

the technology applied. Convex or close to straight curves were obtained for heat, HHP and acid treatments, whereas for PEF treatment the profile of the survival curves was concave. For this reason, curves were fitted to the shoulder log-linear Geeraerd, except those corresponding to PEF treatments, which needed the log-linear Geeraerd equation provided with the mathematical adjustment to describe the tail portion. In this study, tails appeared at an inactivation level of 3 Log cycles, approximately.

For the four treatments, cell inactivation depended on the recovery conditions used (Fig 1, Table 1). The parameter area under the curve (AUC) offers an overall indication of the relative inactivation provided by each treatment, therefore meaningful comparisons among recovery conditions within the same treatment can be made. Although the majority of the authors routinely use

nutritionally complex media, like TSAYE, as the optimal recovery medium, in this research we also used minimum salts-glucose media with cysteine (MM-cys) under anaerobic conditions to improve cells recovery. Besides, we used TSAYE with NaCl added, to prevent growth of sublethally injured cells. When TSAYE-NaCl was used as recovery medium, lower survival was observed in all the treatments applied. The ratios

between the areas associated to the survival curves obtained in TSAYE and in TSAYE- NaCl for heat, HHP, PEF and acid treatments were 2.8, 2.2, 1.5 and 4.5, respectively (Table 1)

Conversely, when cells were recovered in minimal medium MM-cys and anaerobic atmosphere, the amount of survivors was higher for the four technologies studied (Fig 1, Table 1). Thus, these later conditions can be considered as more adequate for cell repair after all the treatments applied. It has to be noted that anaerobic atmosphere was not the only factor that favored cell recovery, since the number of survivors obtained in TSAYE and anaerobiosis was very similar to that obtained under aerobic recovery (data not shown).

Exposure of *E. coli* cells to different technologies caused increase of ROS levels and membrane permeabilization.

Treated cells were stained with different dyes to evaluate ROS presence. DHE (dihydroethidium) was used for the detection of $O_2^{\cdot-}$ due to its relative specificity for this radical. Superoxide oxidizes the dye producing oxyethidium, which binds to DNA showing strong red fluorescence (Gomes *et al.*, 2005), although other reactive

Table 1. Resistance parameters (SL , k_{max} , N_{res} , D and $2D$) obtained from the fitting of Geeraerd model and area under the curve (AUC) corresponding to survival curves of *E. coli* treated by different technologies (heat, HHP, PEF and acidity).

	Heat			PEF		
	TSAYE	TSAYE + NaCl	MM-cys	TSAYE	TSAYE + NaCl	MM-cys
SL	1.37 ± 0.21	0.56 ± 0.27	2.01 ± 0.41			
k_{max}	3.30 ± 0.29	5.54 ± 0.46	1.84 ± 0.26	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.02 ± 0.00
D	0.69	0.42	1.25	-2.89 ± 0.28	-3.06 ± 0.12	
$2D$	2.76	1.39	4.51	76.76	46.06	115.15
RMSE	0.169	0.427	0.173	153.53	92.12	230.30
R^2	0.99	0.99	0.98	0.253	0.225	0.165
AUC	1.79	5.07	0.596	0.97	0.98	0.97
				161	243	84.5
	HHP			Acidity		
	TSAYE	TSAYE + NaCl	MM-cys	TSAYE	TSAYE + NaCl	MM-cys
SL	2.90 ± 0.31	0.21 ± 0.70	6.71 ± 1.46	63.79 ± 7.60	5.67 ± 1.34	
k_{max}	0.57 ± 0.01	0.81 ± 0.05	0.17 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.13 ± 0.01	
D	4.04	2.84	13.54	25.58	17.72	
$2D$	10.98	5.89	33.80	114.96	41.10	
RMSE	0.051	0.146	0.056	0.158	0.040	
R^2	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	
AUC	9.08	19.5	2.55	68.15	307.6	

SL : min; k_{max} : 1/min (heat, HHP and acidity) and 1/ μ s (PEF); D and $2D$: min (heat, HHP and acidity) and μ s (PEF); AUC: min x \log_{10} CFU (heat, HHP and acidity) and μ s x \log_{10} CFU (PEF).

species can also react with DHE (Zielonka and Kalyanaraman, 2010). We also used HPF 3'-(p-hydroxyphenyl-fluorescein) which is oxidized by hydroxyl radicals producing green fluorescence (Gomes *et al.*, 2005). On the other hand, propidium iodide was used to detect membrane permeabilization after treatment. This dye is not permeable, thus it does not penetrate the cell unless the membrane is damaged. Once inside, it binds to DNA and produces red fluorescence.

Figure 2 shows the percentage of stained and inactivated cells along time for each treatment. It has to be noted that the inactivation is represented in a linear scale to allow comparisons with the amount of stained cells. Treatments were applied in order to obtain up to 90-99% of inactivation under standard recovery conditions (TSAYE) to enable comparisons among different treatments. Results showed that there was an increase in ROS level and membrane permeabilization in *E. coli* cells upon exposure to the four agents. The kinetics and order of appearance of both phenomena differed among the technologies.

Inactivation of heat treated cells proceeded progressively as the treatment time increased, following a profile similar to the acquisition of DHE staining (Fig 2A). Staining with HPF occurred later in time. The last phenomenon to happen was permanent permeabilization to PI. For instance, after 2 minutes of exposure to 58°C, only 20% of the cells were permeable to PI, whereas 90% of the cells were stained with DHE and also

90% were inactivated, approximately. Under these treatment conditions, 70% of the cells, approximately, presented staining with HPF.

The response of *E. coli* to HHP treatments (Fig 2B) was similar, although in this case DHE staining was faster and slightly above cell inactivation, in the first minutes of treatment. Also in this case the percentage of cells permeabilized to PI remained always lower than the percentage of inactivated cells.

For PEF treated cells (Fig 2C) close percentages of cell inactivation, membrane permeabilization to PI and DHE staining were observed, whereas HPF staining took place in a lower percentage of cells. Finally, acid-treated cells (Fig 2D) presented a high percentage of staining with HPF and DHE, which was higher than that of inactivated cells. The percentage of permeabilization to PI remained always below 30%, even when 90% of cells appeared to be inactivated.

In order to confirm the order of appearance of these phenomena, DHE-HPF and HPF-PI double staining was carried out. Cells were stained simultaneously with the two dyes, and the amount of cells stained in red, in green, and with both colors was estimated. The results are shown in Figure 3. We would like to point out that these experiments were repeated at different treatment intensities for each agent, and the observations were similar (data not shown). As shown in Fig 3A, when cells were exposed to heat, the appearance of HPF staining in a particular cell was always accompanied by DHE staining. On the contrary, there was a certain percentage

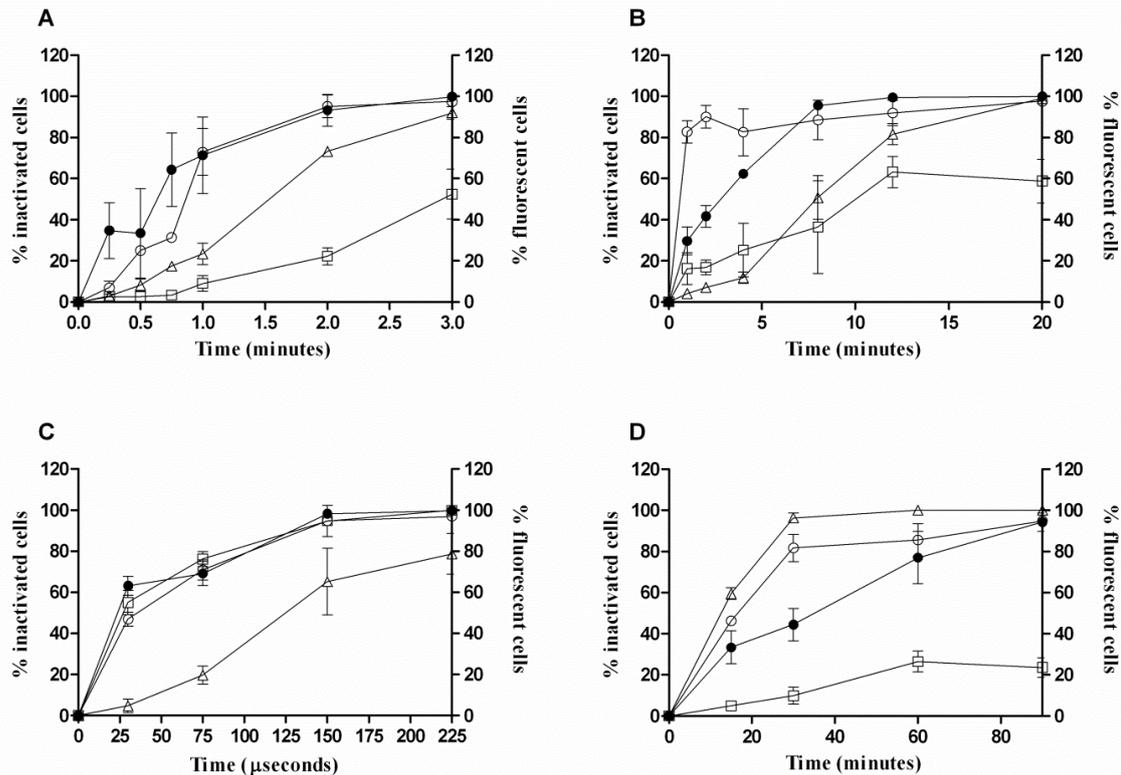


Figure 2. Percentage of inactivated (●) and stained cells with DHE (○), HPF (Δ) and PI (◻) of *E. coli* BW25113 along time for each treatment applied: heat (58°C) (A), HHP (300 MPa) (B), PEF (20 kV/cm) (C) and acidity (pH 3.0) (D).

of cells which presented DHE staining, that did not show HPF staining.

These results could indicate that hydroxyl radicals were formed in the cells from superoxide radicals, as previously demonstrated by other authors (Lushchak, 2011; Imlay, 2003). On the other hand, every heat-treated cell with a PI-permeabilized membrane showed HPF staining, but a certain percentage of cells with HPF staining maintained a non permeabilized membrane. All these results together seemed to indicate that these events occurred in the cells in a particular order, superoxide increased levels preceded hydroxyl increased levels, which in turn preceded permanent membrane permeabilization. For HHP treated cells, results (Fig 3B) indicated an order of cellular events similar to that observed for heat-treated cells.

Results obtained for PEF treated cells were different (Fig 3C), since a great percentage of cells with a PI-permeabilized membrane did not show HPF staining. Finally, in acid-treated cells (Fig 3D), it is remarkable that the appearance of increased levels of DHE staining was always accompanied by HPF staining, indicating a different mechanism involved in ROS formation and/or elimination in these cells.

Relationship between cell recovery and cellular staining

Although results obtained so far suggested that increased levels of ROS after treatments could be related to cell inactivation in some of the technologies studied, it has to be kept in mind that apparent cell inactivation may widely vary depending on the recovery conditions (Fig 1, Table 1). Figure 4 represents the percentage of inactivated cells, measured as cells unable to grow in TSAYE, in TSAYE-NaCl, and in MM-cys, for cells treated with the four technologies. Treatment conditions applied were chosen to obtain an inactivation close to 60% for the four technologies, measured in standard recovery conditions (TSAYE, aerobiosis). The percentage of cells with positive staining with DHE, HPF and PI has also been included in the graph for comparison purposes. Data in Fig 4 show that the percentage of cells with DHE staining was coincident with loss of viability measured in TSAYE-NaCl, for the four technologies ($p>0.05$). These results were also observed for other experimental conditions (data not shown). This fact could indicate that cells with increased levels of ROS would always present lethal injuries. The relationship was lost when cells were recovered under milder environmental conditions, for instance TSAYE or, most notably, minimal medium plus anaerobic atmosphere

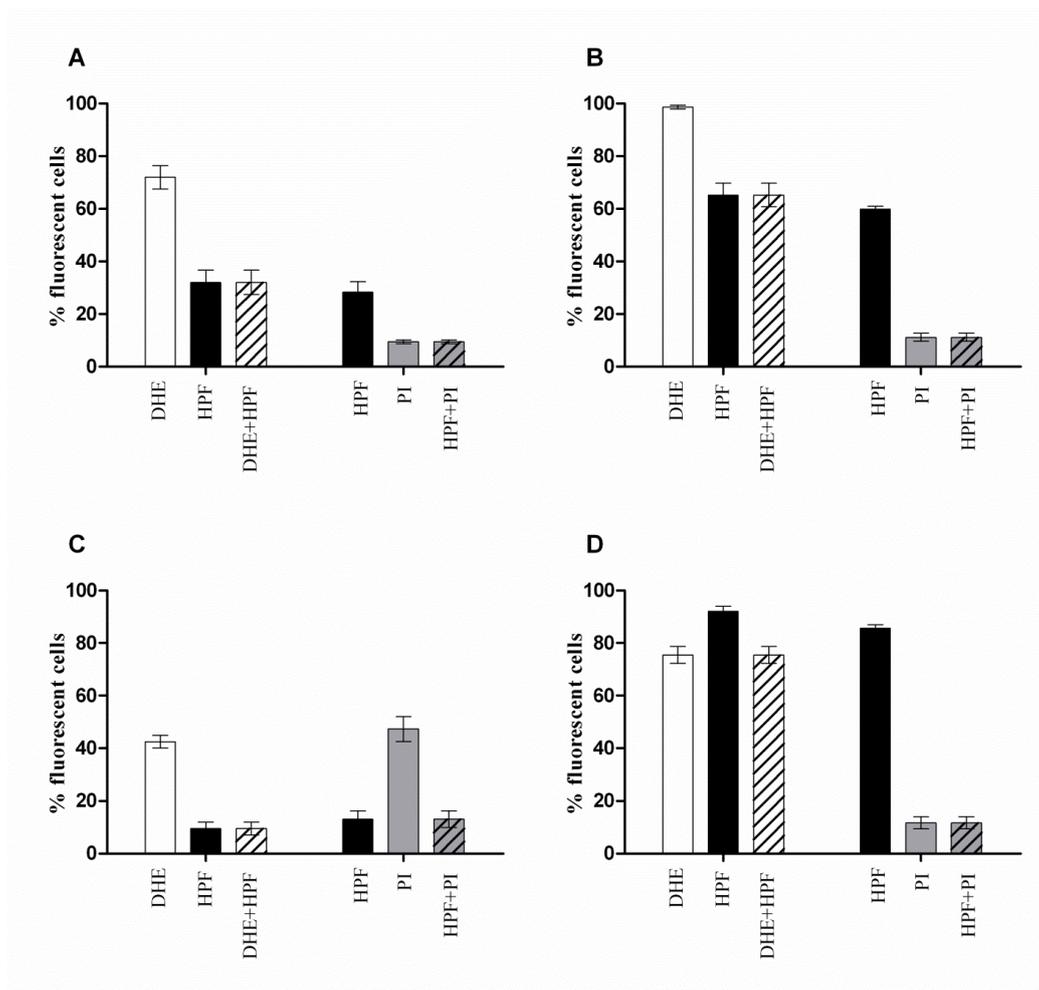


Figure 3. Single (DHE, HPF, PI) and double staining (DHE-HPF and HPF-PI) of *E. coli* cells treated by heat (58°C/1 min) (A), HHP (300 MPa/8 min) (B), PEF (20 kV/cm/30 μ s) and acidity (pH 3.0/30 min) (D).

(MM-cys). Thus, these latter conditions could help cells to effectively control ROS levels and to repair their damages.

Protein aggregation and DNA damage

In order to obtain a deeper insight into the mechanisms of inactivation of the four technologies, we used two complementary approaches to study the importance of two additional cellular events: protein aggregation phenomena and DNA damage. On the one hand, we checked the inactivation of two mutant strains defective either in the chaperone DnaK, involved in refolding of aberrant proteins within the cell, or in the RecA protein, responsible for the DNA-repair mechanism through homologous recombination (Doyle *et al.*, 2015; Shama *et al.*, 2013). And on the other hand, we directly evaluated the degree of protein aggregation and of DNA damage, through staining of treated cells with fluorescein (Mackey and Mañas, 2008), and through agarose electrophoresis of a fragment amplified from DNA extracted from treated cells, respectively.

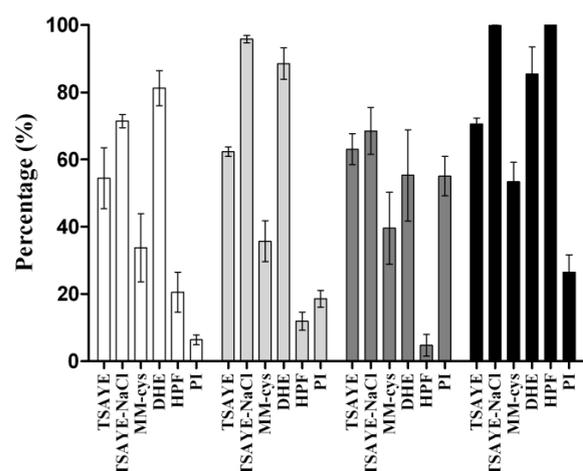


Figure 4. Comparison between the percentage of inactivated cells recovered in TSAYE, TSAYE-NaCl and MM-cys and the percentage of cells stained with DHE, HPF and PI after treating *E. coli* BW25113 with different technologies: heat (58°C/1 min) (white bars), HHP (300 MPa/4 min) (soft grey bars), PEF (20kV/cm/30 μ s) (dark grey bars) and acidity (pH 3.0/ 60min) (black bars).

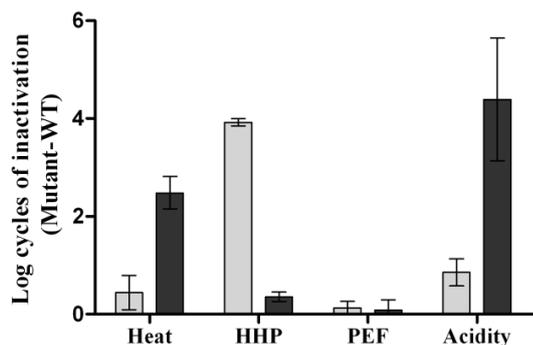


Figure 5. Difference in Log cycles of inactivation of the mutant strains $\Delta DnaK$ (grey bars) and $\Delta RecA$ (black bars) in comparison to the parental strain for the treatments with each technology: heat (58°C/3 min), HHP (300 MPa/8 min), PEF (20 kV/cm/225 μ s) and acidity (pH 3.0/60 min). Cells were recovered in MM- cys.

Figure 5 shows the difference in Log cycles of inactivation of the mutant strains as compared to the parental BW25113. Results showed that the $\Delta DnaK$ mutant strain was particularly sensitive to HHP treatments. Conversely, the $\Delta RecA$ mutant strain was less resistant to heat treatment and to acid treatment. In fact its sensitivity to acid treatment was especially notable. Neither of the two mutant strains showed more sensitivity than the parental to PEF treatments, suggesting that this technology would cause neither DNA nor protein damage in cells.

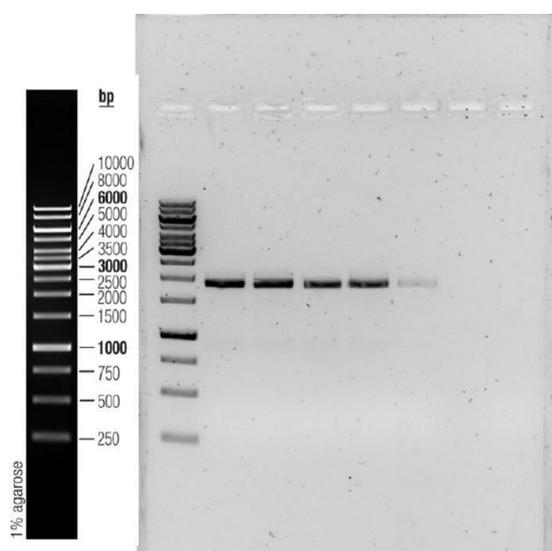


Figure 6. DNA electrophoresis of an 1860bp fragment amplified from DNA extracted from *E. coli* BW25113 native cells and cells treated by heat (58°C/3 min), HHP (300 MPa/8 min), PEF (20 kV/cm/225 μ s) and acidity (pH 3.0/60 min) at equivalent lethality (1.7 \pm 0.3 log cycles). Samples appear in the following order from left to right: DNA ladder, native cells, heat, HHP, PEF and acidity.

From the results in Figure 5 it can be inferred that DNA is a primary cellular target upon acid exposure. Fig 6 shows the DNA electrophoresis of an 1860 bp fragment amplified from

DNA extracted from BW25113 cells treated by the four technologies applied at equivalent lethality. As it can be observed in the Figure, DNA from acid-exposed cells showed poor amplification, in comparison to DNA from native cells or from heat-, HHP- and PEF-treated cells.

Besides, results in Fig 5 also suggested a primary role of protein aggregation and recovery mainly in HHP-treated cells. In order to check this aspect, treated cells were stained with fluorescein and observed under the microscope. HHP-treated cells showed a higher degree of protein aggregation inside the cytoplasm. Microphotographs included in Fig 7 have been obtained with the $\Delta DnaK$ strain to show the effect of the different treatments more clearly, although similar conclusions could be obtained with strain BW25113 (data not shown). As shown in the photographs, protein aggregates were visible in heat treated cells, but most notably, in HHP-treated cells.

DISCUSSION

The level of inactivation of *E. coli* cells to heat, HHP, PEF, and lactic acid obtained was similar to that reported by other authors for *E. coli*, using a complex nutritional medium for the recovery of cells (Aertsen *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2003; Benito *et al.*, 1999; Cebrián *et al.*, 2007) As Figure 1 shows, depending on the technology applied and on the recovery medium used, the survival curves presented different shapes. Generally, curves presented shoulders, except those corresponding to PEF treatments, which exhibited in some cases tails. The presence of tails in PEF survival curves has been frequently reported and has been associated to different phenomena, such as the presence of cells in the population with different resistance to the treatment, adaptation phenomena along the treatment time or heterogeneity within the treatment chamber. In contrast, convex curves are often associated with the presence of a shoulder phenomenon, which has been attributed to the occurrence of sublethally injured cells within the treated population (Mackey, 2000; Mañas y Pagán, 2005; Lou and Yourself, 1997; Cebrián *et al.*, 2007). To this regard, the occurrence of an injured population is frequently estimated by the difference between the number of viable cells in non selective medium (TSAYE) and in selective medium, and normally the loss of the ability to grow in a selective medium with sodium chloride (TSAYE-NaCl) is interpreted as the loss of functionality of the cytoplasmic membrane (Mackey, 2000; Wuytack *et al.*, 2003). As Figure 1 shows, the 4 technologies here studied lead to the appearance of sublethally damaged cells. However, according to our results, the relevance of this phenomenon seemed to be lower in PEF-treated cells than in the other three technologies, since survival curves

obtained under the three recovery conditions used were closer in the case of PEF treatment, which, in addition, showed absence of shoulder phenomena. For instance, if ratio $2D_{TSAYE}/2D_{TSAYE-NaCl}$ is calculated, a value of 1.7 was obtained for PEF treatment, as compared to 2.0, 1.9 and 2.8 for heat, HHP and acid treatments, respectively. Moreover, the ratios between the areas associated to the

survival curves obtained in TSAYE and in TSAYE-NaCl for heat, HHP, PEF and acid treatments were 2.8, 2.2, 1.5 and 4.5, respectively. As a whole, these results would indicate that in PEF treated cells, and under the experimental conditions here used, damage to the cytoplasmic membrane would be more difficult to repair, and thus, probably more directly related to cell inactivation.

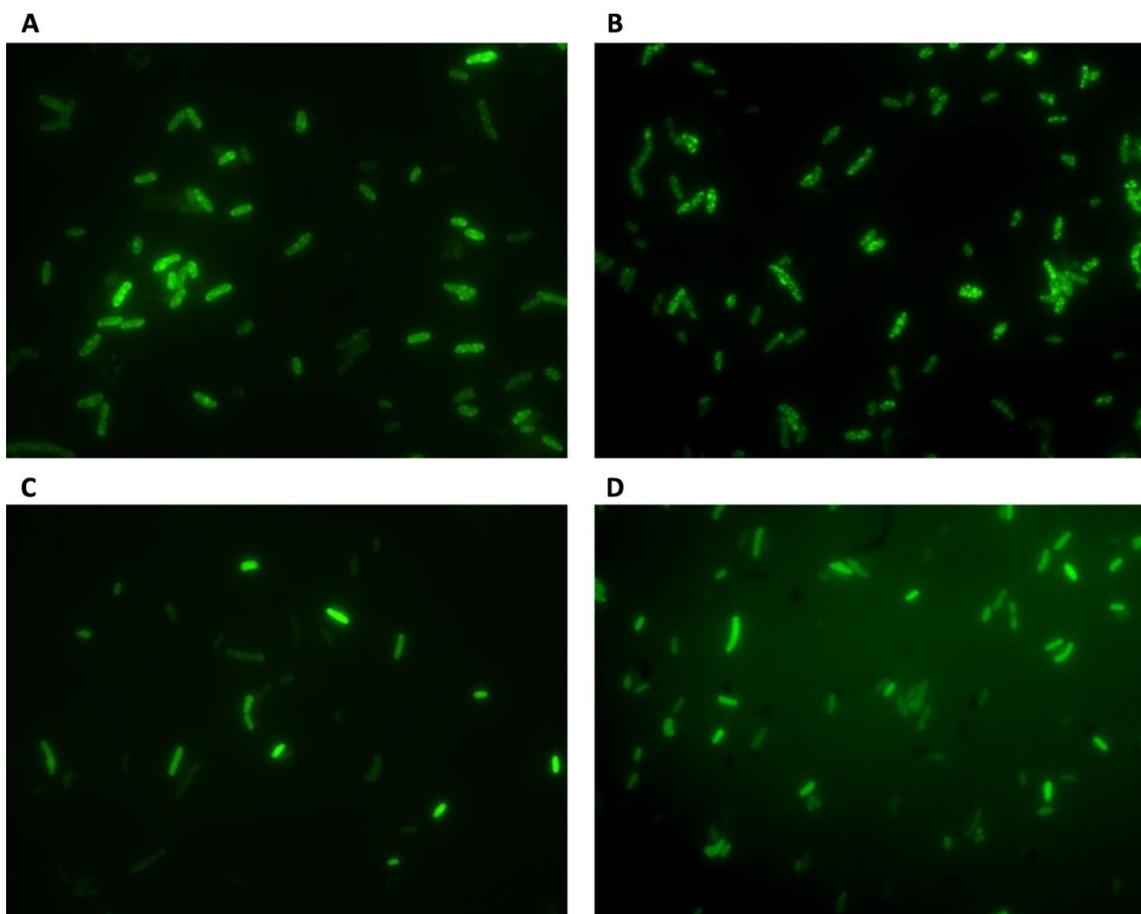


Figure 7. Microphotographs of cells of *E. coli* BW25113 $\Delta DnaK$ treated with heat (58°C/3 min) (A), HHP (300 MPa/8 min) (B), PEF (20 kV/cm/225 μ s) (C) and acidity (pH 3.0/30 min) (D) at equivalent lethality (1.7 ± 0.3 log cycles) stained with fluorescein to observe protein aggregation.

Besides, cells showed a better recovery when MM-cys plus anaerobic conditions were used after treatments. Also in this case, the ratios between the areas associated to survival curves obtained in MM- cys and in TSAYE (3.0, 3.6, and 1.9 for heat, HHP and PEF respectively) showed that for PEF treatments, the amount of cells with sublethal injuries, able of recover and resume growth, was always lower. With regards to the higher cell recovery observed in minimal medium MM-cys and anaerobic atmosphere, it is reasonable to think that the protective effect observed in MM-cys medium could be ascribed to its low redox potential and to the absence of oxidative

species generated during autoclaving, as previously demonstrated by other authors (Mackey, 2000; Cebrian *et al.*, 2016). These observations suggested that an oxidative component was involved in cell inactivation and/or recovery after treatment, for the four technologies here studied. It is important to keep in mind that also cytoplasmic membrane alterations seemed to occur in cells treated by the four technologies.

In order to increase the knowledge about the possible structure and mechanisms involved in microbial inactivation by these technologies, particular fluorescent dyes were used to evaluate ROS presence and membrane

permeabilization. As Figure 2 shows, results obtained in this study revealed that the kinetics and order of appearance of oxidative species and membrane permeabilization differed among the technologies. Membrane permeabilization to PI seemed to occur simultaneously to cell inactivation only in PEF treated cells, whereas in the other three technologies, a large percentage of inactivated cells maintained a membrane impermeable to PI. Thus, inactivation by heat, HHP and acidity seems to require additional cellular events other than loss of permeability of the cytoplasmic membrane to PI. Although we cannot discard that more subtle membrane alterations, that may contribute to cell inactivation, occurred in these cells before permanent permeabilization to PI takes place, it seems clear from our data that the degree of membrane alteration and its relevance in cell survival is different depending on the technology applied. The results here obtained confirm the pivotal role of the cytoplasmic membrane in cell inactivation by PEF, in comparison to other technologies. It is noteworthy, according to our results, that the use of the so-called vital dyes to estimate bacterial viability requires a careful interpretation, since the response to PI of *E. coli* seems to depend on the agent applied.

On the other hand, also the order of appearance of the different ROS seemed to vary depending on the treatment applied. For heat, HHP and PEF treatments the amount of cells stained with HPF was lower than the amount of cells stained with DHE, and only after longer treatments, able to attain more than 95% of inactivation, both staining percentages were similar. However, in the case of acid-exposed cells, the amount of HPF-stained cells was slightly superior to that of DHE-stained cells. As a whole view, and taking into account results from Fig 2 and 3, increased levels of ROS and membrane permeabilization were detected in cells treated by the four technologies, therefore the two phenomena could be involved in cell inactivation. However, the relative importance of the two cellular events on cell survival and inactivation seems different. For heat, HHP and PEF treated cells, hydroxyl radicals appeared to be formed as a consequence of superoxide radicals presence, whereas for acid-treated cells the order of appearance of these two radicals was opposite. With regards to membrane permeabilization to PI, it occurred always well after cell inactivation, except in the case of PEF treated cells. We can hypothesize that increased ROS levels could be the consequence of an extensively damaged membrane in the case of PEF treatment, but not in the case of the other three technologies. Thus, no clear-cut relationship between these two phenomena can be established, although the occurrence of subtle membrane alterations leading to increased ROS levels, such as for instance damages in

particular enzymes in the respiratory chain, cannot be ruled out. Besides, in the particular case of acid-treated cells, probably additional cellular mechanisms are taking place giving rise to an increased level of hydroxyl radicals. For instance, if particular enzymes or structures involved in iron homeostasis were more affected by acid exposure, increased intracellular Fenton reaction could rise to uncontrolled hydroxyl levels inside the cell.

Results obtained in this study also showed that depending on the recovery conditions cells could repair their damages. Therefore, the role of increased levels of ROS on cell inactivation and survival remains unclear, since a certain proportion of cells with increased levels of ROS were able to recover and survive under appropriate environmental conditions. Whether increased ROS levels arise from unbalances in the electron transport chain located in the membrane, as suggested by other authors (Mols and Abee, 2011), or from other cellular alterations such as the massive loss of activity of detoxifying enzymes, disassembly of intracellular iron-sulfur clusters, or loss of antioxidant intracytoplasmic molecules (for instance glutathione), is something that remains to be investigated. Also, the exact reason behind the protective effect of MM-cys-anaerobiosis is not known. As discussed above, the most plausible explanation is that it could be ascribed to the fact that it represents a lower oxidative-stress burden, as compared to other recovery conditions. In any case, these results underscore the need to optimize recovery media and conditions, in order to more accurately evaluate the number of survivors to food processes. From our results it can be concluded that complex media under aerobic recovery conditions underestimate the number of survivors to all the technologies studied.

A great percentage of heat-, HHP-, and lactic acid-treated cells was unable to grow in the presence of NaCl, while maintained impermeability to PI. Only in the particular case of PEF, both percentages were coincident, results that are in concordance to those previously reported with *S. aureus* (Cebrián *et al.*, 2016). These results indicate that the nature, magnitude and relevance of membrane damage are different depending on the technology used. We can hypothesize that heat, HHP and acid may be either affecting structures other than the membrane itself, but also involved in NaCl homeostasis, or, alternatively, may be causing subtle alterations in the cytoplasmic membrane, unable to increase permeability to PI, but still relevant to NaCl homeostasis.

Other alterations observed were DNA damage in acid-treated cells, possibly related to the increased presence of hydroxyl radical (Fig 2) (Park and Imlay, 2003), which is recognized as highly toxic for the genetic

material; and protein aggregation, especially in HHP treatment. This phenomenon has been previously described for HHP-treated cells (Mackey and Mañas, 2008; Govers *et al.*, 2017) and also for heat-treated cells (Govers *et al.*, 2017). Protein aggregates can be repaired by the cellular machinery to some extent; however, it is reasonable to think that if the degree of protein damage surpasses a certain threshold, or particular repair proteins are affected, the cellular viability may be compromised. The presence, location, size and movement of aggregates seem to determine cellular survival (Govers *et al.*, 2017). More research is needed to elucidate the exact role of protein aggregates and the relationship with other cellular alterations.

Concluding remarks

In summary, results show that increased ROS levels are found inside *E. coli* cells after all the treatments applied and their appearance is progressive along treatment time, despite the different nature of these technologies. Only in the particular case of PEF-treated cells occurrence of increased ROS level was coincident with permanent permeabilization to PI, which can be considered as indicative of seriously compromised membranes. On the contrary, for the other three technologies, the presence of increased ROS levels occurred well before permeabilization to PI. In cells treated by heat, HHP and PEF, DHE staining preceded HPF staining, and only in the particular case of acid-treated cells, HPF staining preceded DHE staining, suggesting that in these cells, hydroxyl radicals were formed through a different mechanism, and possibly played a more relevant role, particularly in relation to DNA damage. The presence of protein aggregates was noticeable in heat and in HHP-treated cells, most notably in the latter.

Results obtained in this investigation add new data to help to understand the mode of action of food preservation technologies on bacterial cells. This knowledge would help in the design of more effective processes.

Acknowledgements

The authors would like to thank the European Regional Development Fund, MINECO-CICYT (AGL2012-33522, AGL2015-69565-P) and the Department of Innovation Research and University of the Aragon Government and European Social Fund (FSE) for the support (predoctoral grant M. Marcén, C093/2014).

REFERENCES

Aertsen A, De Spiegeleer P, Vanoirbeek K, Lavilla M, Michiels CW. 2005. Induction of oxidative stress by high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. *Applied Environmental Microbiology* 71:2226-2231.

Álvarez, I, Virto R, Raso J, Condón S. 2003. Comparing predicting models for the *Escherichia coli* inactivation by pulsed electric fields. *Innovative Food Science Emerging Technologies* 4:195-202.

Baatout S, De Boever P, Mergeay M. 2005. Temperature- induced changes in bacterial physiology as determined by flow cytometry. *Annals of Microbiology* 55:73-80.

Benito A, Ventoura G, Casadei M, Robinson T, Mackey B. 1999. Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157 to high hydrostatic pressure, mild heat, and other stresses. *Applied Environmental Microbiology* 65:1564-1569.

Cebrián G, Condón S, Mañas P. 2016. Influence of growth and treatment temperature on *Staphylococcus aureus* resistance to pulsed electric fields. Relationship with membrane fluidity. *Innovative Food Science Emerging Technologies* 37:161-169.

Cebrián G, Sagarzazu N, Pagan R, Condón S, Mañas P. 2007. Heat and pulsed electric field resistance of pigmented and non-pigmented enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* in exponential and stationary phase of growth. *International Journal of Food Microbiology* 118:304-311.

De Spiegeleer P, Sermon J, Lietaert A, Aertsen A, Michiels C. 2004. Source of tryptone in growth medium affects oxidative stress resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology* 97:124-133.

Doyle SM, Shastry S, Kravats AN, Shih YH, Miot M, Hoskins JR, Stan G, Wickner S. 2015. Interplay between *E. coli* DnaK, ClpB and GepE during protein disaggregation. *Journal of Molecular Biology* 427:312-327.

Geeraerd A, Herremans C, Van Impe J. 2000. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology* 59:185-209.

Geeraerd A, Valdramidis V, Van Impe J. 2005. GInaFIT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology* 102:95-105.

Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR. 1994. *Methods for General and Molecular Bacteriology*, vol 1325. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Gomes A, Fernandes E, Lima JL. 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemistry and Biophysical Methods* 65:45-80.

Govers SK, Gayan E, Aertsen A. 2017. Intracellular movement of protein aggregates reveals heterogeneous inactivation and resuscitation dynamics in stressed populations of *Escherichia coli*. *Environmental Microbiology* 19:511-523.

Gusarov I, Nudler E. 2005. NO-mediated cytoprotection: instant adaptation to oxidative stress in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 102:13855-13860.

Imlay JA. 2003. Pathways of oxidative damage. *Annual Review of Microbiology* 57:395-418.

Imlay JA. 2013. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nature Reviews Microbiology* 11:443.

Klotz B, Mañas P, Mackey BM. 2010. The relationship between membrane damage, release of protein and loss of viability in *Escherichia coli* exposed to high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology* 137:214-220.

Lado BH, Yousef AE. 2002. Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. *Microbes Infection* 4:433-440.

Lou Y, Yousef AE. 1997. Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Applied Environmental Microbiology* 63:1252-1255.

Lushchak VI. 2011. Adaptive response to oxidative stress: bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology and Pharmacology* 153:175-190.

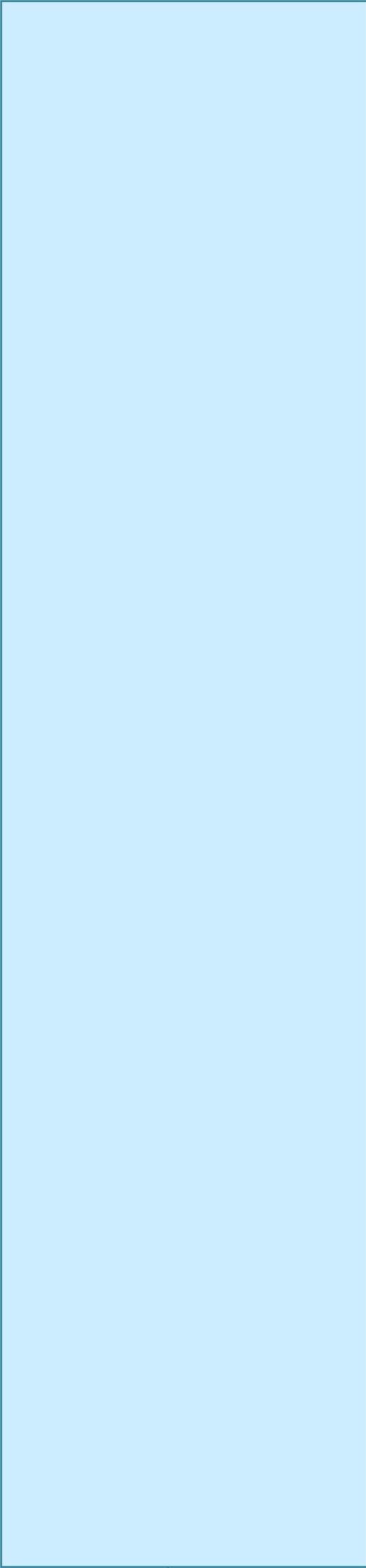
Mackey B. 2000. Injured bacteria, p 315-341. In Lund B, Baird-Parker, TC., Gould, GW. Eds. (ed), *The microbiological safety and quality of food*, vol 1. Springer.

Mackey BM, Mañas P. 2008. Inactivation of *Escherichia coli* by high pressure, p 53-85, *High-pressure microbiology*. American Society of

- Microbiology.
- Mackey BM, Seymour DA. 1987. The effect of catalase on recovery of heat-injured DNA-repair mutants of *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*. 133:1601-1610.
- Malone AS, Chung YK, Yousef AE. 2006. Genes of *Escherichia coli* O157: H7 that are involved in high-pressure resistance. *Applied Environmental Microbiology* 72:2661-2671
- Mañas P, Pagán R. 2005. Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology* 98:1387- 1399.
- Marcén M, Ruiz V, Serrano MJ, Condón S, Mañas P. 2017. Oxidative stress in *E. coli* cells upon exposure to heat treatments. *International Journal of Food Microbiology* 241:198-205.
- Miles CA. 2006. Relating cell killing to inactivation of critical components. *Applied Environmental Microbiology* 72:914-917.
- Mols M, Abee T. 2011. Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*. *Environmental Microbiology* 13:1387-1394.
- Mols M, Pier I, Zwietering MH, Abee T. 2009. The impact of oxygen availability on stress survival and radical formation of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology* 135:303-311.
- Mols M, Van Kranenburg R, Van Melis CC, Moezelaar R, Abee T. 2010. Analysis of acid-stressed *Bacillus cereus* reveals a major oxidative response and inactivation- associated radical formation. *Environmental Microbiology* 12:873-885.
- Pakhomova ON, Khorokhorina VA, Bowman AM, Rodaitė-Riševičienė R, Saulis G, Xiao S, Pakhomov AG. 2012. Oxidative effects of nanosecond pulsed electric field exposure in cells and cell-free media. *Archives Biochemistry Biophysics* 527:55-64.
- Park S, Imlay JA. 2003. High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the fenton reaction. *Bacteriology* 185:1942-1950.
- Patsoukis N, Papapostolou I, Georgiou CD. 2005. Interference of non-specific peroxidases in the fluorescence detection of superoxide radical by hydroethidine oxidation: a new assay for H₂O₂. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 381:1065-1072.
- Richard H, Foster JW. 2004. *Escherichia coli* glutamate-and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. *Journal of Bacteriology* 186:6032-6041.
- Saldaña G, Puértolas E, Álvarez I, Meneses N, Knorr D, Raso J. 2010. Evaluation of a static treatment chamber to investigate kinetics of microbial inactivation by pulsed electric fields at different temperatures at quasi-isothermal conditions. *Journal of Food Engineering* 100:349-356.
- San Martín M, Barbosa-Cánovas G, Swanson B. 2002. Food processing by high hydrostatic pressure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42:627-645.
- Sharma V, Sakai Y, Smythe KA, Yokobayashi Y. 2013. Knockdown of *recA* gene expression by artificial small RNAs in *Escherichia coli*. *Biochemistry and Biophysical Research Communications* 430:256-259.
- Stanier RY, Ingraham JL, Wheelis ML, Painter PR. 1992. *Microbiología*, 2nd ed. Reverté S.A, Barcelona.
- Suh JH, Knabel SJ. 2000. Comparison of different reducing agents for enhanced detection of heat-injured *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 63:1058-1063.
- van de Guchte M, Serror P, Chervaux C, Smokvina T, Ehrlich SD, Maguin E. 2002. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82:187-216.
- Wuytack EY, Phuong LDT, Aertsen A, Reyns K, Opstal I, Diels A, Michiels C. 2003. Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enteric* serovar Typhimurium by heat and by different nonthermal treatments. *Journal of Food Protection* 66:31-37.
- Zielonka, J., Kalyanaraman, B., 2010. Hydroethidine-and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: another inconvenient truth. *Free Radical Biology and Medicine*. 48(8), 983-1001.

4.4 Efecto del glutatión en la inactivación microbiana por diversas tecnologías.

- **Manuscrito IV: Protective effect of glutathione on *E. coli* cells upon lethal heat stress.**
- **Manuscrito V: Role of glutathione on *E. coli* resistance to technologies of food preservation.**



Protective effect of glutathione on *E. coli* upon lethal heat stress

ABSTRACT

Heat treatments are widely used by food industry to obtain safe and stable products, therefore a deeper knowledge of its mode of action on microorganisms would allow a better profit of this technology. Heat shows a multitarget mechanism of action on bacteria, affecting various cellular structures, and causing unbalances in several homeostatic parameters. The aim of this work was to study the effect of glutathione on bacterial survival against heat treatments, in order to acquire knowledge about the mode of action of heat on bacterial cells. Cells were treated in presence or absence of added glutathione and the level of inactivation, soluble protein concentration, enzymatic activities, intracellular ROS level and membrane damages were studied. Results showed that glutathione protected microorganisms against heat inactivation. Moreover, glutathione in the treatment medium kept intracellular enzyme activity, membrane structure and reduced ROS detection. Besides, glutathione decreased sublethal injury in *E. coli*. Data presented in this work add new knowledge about bacterial inactivation and survival by heat

INTRODUCTION

Heat treatments are commonly used by the food industry to inactivate pathogenic and spoilage microorganisms. Despite the wide use of thermal treatments, many aspects about its mode of action on microorganisms still remain unclear. A better knowledge of the physiology of microbial inactivation by heat would permit to obtain a better profit of this technology (Smelt and Brul, 2014). Heat shows a multitarget mode of action in bacteria, causing damages in different cell structures such as the envelopes, DNA, RNA, ribosomes and particular enzymes (Mackey, 2000; Nguyen *et al.*, 2006; Cebrián *et al.*, 2017). Such cellular damages, depending on their intensity and severity, may cause cell inactivation and/or the occurrence of sublethally injured cells. These can be defined as cells able to grow and survive only under appropriate environmental conditions that allow the recovery of the cellular lesions before growth is resumed (Mackey, 2000). The final events leading to lethal or sublethal injury in bacterial cells, and the physiology of cell recovery have not been sufficiently studied, despite their practical importance for the food industry.

One of the physiological aspects that is gaining attention in the last years is the involvement of an oxidative component in the inactivation and damage of cells exposed to a variety of agents used in the food industry, such as heat, acid or high hydrostatic pressure (Aertsen *et al.*, 2005; Mols *et al.*, 2010; Marcén *et al.*, 2017). It has been suggested that exposure to agents of several nature may cause an unbalance in the intracellular redox homeostasis (Mols and Abee, 2011) that could contribute to cell inactivation and sublethal injury. The causes behind an impaired cellular redox homeostasis after exposure to a stressing agent include, among other mechanisms, an increase in the generation of reactive oxygen species, disulfide bond formation in proteins, disassembly of iron-sulfur clusters, and denaturation of protective enzymes (catalases,

alkylhydroperoxidases, superoxide dismutases, enzymes of the thioredoxin and glutathione systems)(Cabiscol *et al.*, 2000; Imlay, 2013).

Glutathione is considered as the most potent natural antioxidant molecule, with important cellular functions in eukaryotic cells; however its role in prokaryotes has received less attention (Smirnova and Oktyabrsky, 2005). Glutathione is present only in some bacterial genus, mostly Gram negative (Fahey *et al.*, 1978), although analogs have been described in other bacterial groups (Fahey, 2013). It is a tripeptide (L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine) with reducing properties and ability to eliminate free radicals, due to the presence of a sulfhydryl group in the cysteine, which can serve as an electron donor. Glutathione (GSH) reacts with free radicals, and participates in thiol-disulfide interchanges with proteins and other thiols, rendering mixed disulfides and glutathione disulfide dimers (GSSG). GSSG is then recycled through the action of the enzyme glutathione reductase (gor), and mixed disulfides are also recycled by the action of glutaredoxins (grx) (Smirnova and Oktyabrsky, 2005). It has been suggested that glutathione could exert an important role in stress resistance in bacteria, however little information is available on stresses other than direct oxidative agents. To this regard, it has been demonstrated that *E. coli* mutant strains defective in glutathione synthesis or in glutathione reductase activity are less resistant to osmotic stress and to acid pH (Smirnova and Oktyabrsky, 2005; Masip *et al.*, 2006).

In a previous work carried out in our laboratory, we observed that the addition of glutathione to the heating medium protected *E. coli* against inactivation (Marcén *et al.*, 2017). The objective of this work was to further study the effect of glutathione on bacterial survival to heat, using *E. coli* as a model microorganism, with the final aim of gaining insight into the physiological mechanism of cell protection, and obtaining a deeper knowledge about the

mode of action of heat on bacterial cells.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. *Escherichia coli* BW25113, *E. coli* CECT 4201, *Salmonella enterica* serovar Senftenberg 775W and *Lactobacillus plantarum* CECT 748 were used in this study. The strains were stored at -80°C. To prepare precultures, flasks containing 10 mL of sterile broth were inoculated with one single colony from an agar plate. The precultures were incubated overnight at 37°C, under agitation. Subsequently, cultures were obtained by inoculating a flask with 50 mL of broth with 100 µL of the preculture, and incubation at 37°C under agitation, until stationary phase of growth was reached after 18-24 hours incubation (2×10^9 cfu/ mL, approximately). Media used were TSBYE and TSAYE (Tryptic Soy Broth or Agar, respectively, with 0.6% Yeast Extract, Oxoid, Basingstoke, UK) for *E. coli* and *Salmonella*, or MRS broth and agar (Oxoid) for *L. plantarum*. Unless otherwise indicated, *E. coli* and *Salmonella* were grown under aerobic atmosphere, whereas *L. plantarum* was grown under anaerobic atmosphere in a variable atmosphere incubator (MACS VA500, Don Whitley Scientific Limited, Shipley, United Kingdom), with a gas composition of 0% oxygen, 5% hydrogen, 5% carbon dioxide and 90% nitrogen, plus the palladium catalyzer.

In some experiments, where specified in the text, 10 mM of filter-sterilized reduced L-glutathione (Sigma-Aldrich) was added to the growth medium. This concentration, chosen in preliminary experiments, did not inhibit the growth of *E. coli* untreated cells neither in liquid nor in solid media (data not shown).

Heat treatments. To determine the heat resistance of *E. coli*, heat treatments were carried out in glass tubes, which contained 4.5 mL of sterile PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma, San Louis, USA), submerged in a thermostated water bath. Once the PBS reached the desired temperature ($\pm 0.1^\circ\text{C}$), it was inoculated with 0.5 mL of the microbial cell suspension to obtain a concentration $\geq 10^8$ cells/mL. After inoculation, 0.1 mL samples were collected at different heating times for survival counting. When needed, reduced glutathione was added to the sterile PBS at the desired concentration.

Recovery after heat treatment. After heat treatment, samples were serially diluted, plated in TSAYE, and incubated at 37°C in aerobic conditions. For *L. plantarum*, MRS-agar and anaerobic conditions were used. After 24 h, colony forming units were counted. Although these were the standard recovery conditions used in most experiments, in some cases cells were also recovered under different conditions, in order to detect the occurrence of sublethally injured cells, or alternatively, to improve recovery.

To detect sublethally injured cells, cells were recovered in TSAYE with NaCl (4.0%, Panreac) or bile salts added (0.2%, Oxoid) (TSAYE-NaCl, TSAYE-BS). These concentrations correspond to the maximum non inhibitory concentrations for native cells (CMNI), and were previously determined (data not shown). It is generally assumed that the presence of NaCl prevents the outgrowth of cells with a damaged cytoplasmic membrane, whereas the presence of bile salt prevents the outgrowth of cells with a damaged outer membrane (Mackey, 2000). On the other hand, minimal medium M9 glucose-salts agar supplemented with FeSO₄ (10 mg/L) (Gerhardt, 1994; Stanier and Villanueva, 1996), and enriched with 3 mM L-cysteine HCl to create a low redox potential environment (Gerhardt, 1994; Suh and Knabel, 2000) was chosen to improve the recovery of cells (MM-Cys) (Marcén *et al.*, 2017). In this latter case, anaerobic atmosphere was used in order to further reduce the oxidative component of the recovery conditions, and 72 h were allowed for full colony development. Plates were counted after incubation, and results were expressed as the number of survivors (Log N_i/ mL) or the fraction of inactivated cells (Log cycles of inactivation) after a fixed treatment time.

Study of the recovery after heat treatment. To study the kinetics of recovery, cells were heat treated at 58°C for 1 or 6 minutes, and then suspended in TSBYE and in TSBYE plus 10 mM glutathione added, at 37°C. Samples were collected after different times (0-120 min) and plated in the non-selective (TSAYE and MM-Cys), and in the selective agars (TSAYE-NaCl, TSAYE-BS). These plates were incubated in the conditions described above for colony counts.

Fluorescence staining. The presence of ROS and the permeabilization of the membrane in cells were studied through staining with specific fluorochromes followed by epifluorescence microscopy (Marcén *et al.*, 2017). Treated cells, at approximately 10^8 cells, were centrifuged, resuspended in PBS and incubated with the desired fluorescence dye.

To detect the presence of ROS, cells were stained with dihydroethidium (DHE, 50 µM/90 minutes). DHE is a membrane-permeable probe that binds to DNA upon oxidation by ROS, including superoxide, rendering a strong red fluorescence (Gomes *et al.*, 2005). To study the permeabilization of the membrane, cells were stained with propidium iodide (PI, 3 µM/30 min). Cells with permeabilized membranes allow the entrance of the dye inside the cell, rendering cells with intense red fluorescence.

A positive and a negative control of staining were always included. The negative control corresponded to untreated cells, whereas the positive control consisted of cells exposed to the superoxide-generating agent plumbagin (Sigma Aldrich) (5.3 mM/10 min) in the case of DHE (Hassan and Fridovich, 1979; Farr *et al.*, 1985), or exposed to an intense heat treatment (70°C/20 min), in the case of PI. To analyze samples, a Nikon Eclipse E400 phase contrast and fluorescence microscope (Nikon Corporation, Japan) was used. Images were obtained with a high resolution camera (AxioCam MRc, Zeiss, Germany) and processed with the software ZEN 2012 (Zeiss, Germany). Total and fluorescent cells were counted from photographs taken from each sample, and at least three different representative microscopic fields, containing 100-200 cells, approximately, were used for quantification.

To detect and visualize protein aggregates, cells were stained with fluorescein sodium salt (Sigma-Aldrich), with a final concentration of 65 µM, for 10 minutes. After this contact time, cells were washed three times to eliminate the background and observed under epifluorescence microscope.

Determination of intracellular glutathione and soluble protein. The relative intracellular glutathione was determined in *E. coli* cells grown and/or treated in the presence or absence of glutathione. In all cases, cells were washed three times in PBS by centrifugation, concentration was adjusted to 10^8 cells/ mL, and cells were lysed with 0.1 mm glass beads with a bead-beater instrument (BioSpec product, Oklahoma, USA). 5 rounds of 10 seconds were applied, and samples were cooled on ice between rounds. It was checked through microscopic examination that more than 95% of cells had been lysed. Lysed samples were centrifuged and the supernatant (soluble fraction) was reserved for analysis of glutathione and protein content. Total glutathione was determined with the Glutathione Assay Kit (Sigma-Aldrich), based on the determination of sulfhydryl groups (Ellmman's reactive), using the enzyme glutathione reductase plus NADPH to recycle oxidized glutathione. Protein content was determined by the BCA method following the standard protocol and using bovine serum albumin as standard (Sigma-Aldrich). Results were expressed as nM of glutathione per mL of cell extract.

Enzymatic activity. Cellular enzymatic activity was checked before and after heat treatment. For this purpose two enzymes were selected: β-galactosidase and superoxide dismutase (SOD). In both cases, cells were lysed as described above, and the soluble intracellular content was analyzed for enzymatic activity. β-galactosidase activity was determined by the ONPG hydrolysis method, by measuring the absorbance at 405 nm after 10 minutes of reaction time (Lederberg, 1950). SOD activity was measured using a kit based on the detection of WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate sodium salt) which is reduced by superoxide anions. Reduced WST-1 is measured by absorbance at 438 nm (ScienCell, Carlsbad, CA, USA).

Statistical analysis. Unless indicated in the text, the experimental determinations were performed at least in triplicate with independent microbial cultures. Data in figure correspond to the average and the mean standard deviation (error bars). Student's *t* tests were carried out using the GraphPad PRISM 5 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA), and differences were considered significant for $p \leq 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Influence of the addition of glutathione in the growth medium, treatment medium and recovery medium on *E. coli* survival

Figure 1 shows the inactivation attained in *E. coli* BW25113 after a heat treatment at 58°C for 5 minutes, of cells grown in TSBYE with (1B) and without glutathione (1A). Cells were treated in PBS with or without glutathione and recovered in TSAYE with or without glutathione added. As it can be observed in the graphs, external glutathione exerted a different effect, depending on the moment of the addition.

The presence of glutathione in the growth medium did not exert any influence ($p > 0.05$), and *E. coli* cells grown with and without glutathione, in TSBYE, showed the same pattern of heat resistance, independently of the treatment and recovery conditions used.

The presence of 10 mM glutathione added in the heating medium protected *E. coli* against heat inactivation under all the experimental conditions used ($p < 0.05$). This protective effect was of notable magnitude, ranging between 1.6 and 2.0 log cycles, under these particular treatment conditions (58°C/5 min). When glutathione was added in the recovery agar it also exerted a protective effect in heated *E. coli* cells. However this effect was of lower magnitude, accounting for 0.3-1.0 log cycle, and was statistically significant only in two cases.

Given the fact that the presence of glutathione in the growth medium did not modify the behavior of cells, cells were always grown in TSBYE without glutathione thereafter, for heat resistance experiments.

We studied ($n=2$) if the protective role of glutathione against heat inactivation was a common effect on various microorganisms, using *Salmonella enterica* serovar Senftenberg 775W and *Lactobacillus plantarum* CECT 748. Figure 2A and 2B show that the inactivation was higher when cells were treated in PBS without glutathione in both cases.

Thus, these results seem to confirm that the addition of glutathione in the heating medium protected cells of different prokaryotes against heat inactivation, Gram negative and Gram positive.

It has to be pointed out that the effect of glutathione in the heating medium was concentration-dependent, in such a way that protection increased with the externally added concentration up to a certain threshold, which was different

depending on the microorganism studied. Once that threshold was surpassed, glutathione exerted a sensitization effect. For instance, concentrations up to 8 mM progressively protected *L. plantarum* against heat, whereas 10 mM already sensitized cells. For *E. coli* BW25113, higher concentrations, 20 mM, sensitized cells to heat (data not shown). The reasons behind this behavior are not known and deserve further attention.

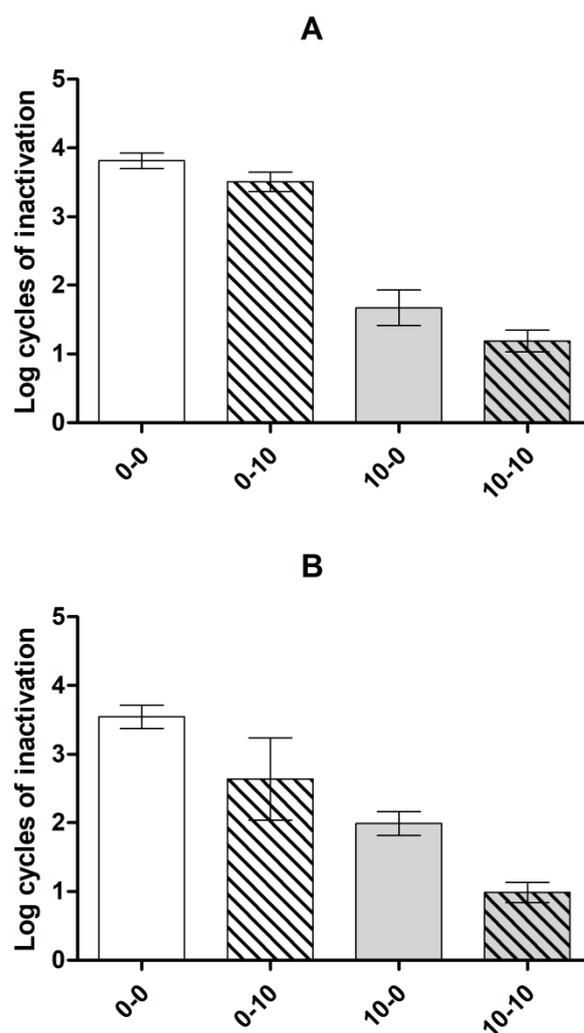


Figure 1. Log₁₀ cycles of inactivation of *E. coli* BW25113 grown in the absence (A) or presence (B) of glutathione and treated at 58°C for 5 minutes in PBS with (grey bars; 10-0, 10-10) or without glutathione (white bars; 0-0, 0-10). Cells were recovered in TSAYE with (stripped bars; 0-10, 10-10) or without (plain bars; 0-0; 0-10) glutathione added.

Relation between intracellular glutathione, soluble protein and enzymatic activity

We measured the amount of intracellular glutathione in cells grown in TSBYE without glutathione and treated with or without glutathione (Table 1).

The amount of intracellular soluble protein was also measured. Cells heated in the presence of 10 mM glutathione showed a much higher intracellular content (nM

glutathione/ mL cellular extract) than untreated cells, almost 7 fold higher, and also than cell heated in PBS without glutathione, 16 fold higher. In fact, glutathione appeared to be depleted from cells heated in PBS without external glutathione added. When we attempted to normalize the glutathione content in relation to the total soluble protein, in order to minimize the possible influence of the efficacy of the mechanical lysis method used, we realized that the intracellular soluble protein content was actually very low in heated cells, as compared to untreated cells, especially in cells heated in PBS without glutathione added. Cells heated in PBS with glutathione maintained 21% of the soluble protein content of native cells, whereas cells heated in PBS without glutathione retained only 3%. In our opinion, this difference in protein content retention cannot be attributed to experimental variations in the efficacy of the lysis method.

significantly higher amount of soluble protein, fact that could contribute to their greater survival capability. His effect can be attributed to the capacity of glutathione to form mixed disulfides with unfolded proteins, thus preventing the irreversible oxidation of thiol groups in proteins and helping in recovery of their native state (Masip *et al.*, 2006).

Table 1. Amount of intracellular glutathione (nMol/ mL) and total soluble protein (mg/ mL) in cells grown in TSBYE without glutathione, treated with and without glutathione (58°C/5 min). Different letters in columns indicate statistical differences ($p>0.05$).

	Glutathione (nM/ mL)	Protein (mg/ mL)
Untreated	9.3±0.02 ^a	7.611±0.23 ^a
Treated with glutathione	63.2±0.02 ^b	2.275±0.01 ^b
Treated without glutathione	3.8±0.01 ^a	0.327±0.01 ^c

In order to further investigate this aspect, we tested whether the activity of two different cellular enzymes, β -galactosidase and SOD, was preserved or not after heating in the presence of glutathione. The results are included in table 2.

Table 2. Concentration of *B*-gal (UA/ mL) and SOD (UA/ mL) after heating in the absence and presence of glutathione (58°C/5 min). Different letters in columns indicate statistical differences ($p>0.05$).

	β -galactosidase (UA/ mL)	SOD (UA/ mL)
Native cells	542.6±23.29 ^a	5.267±0.21 ^a
PBS	5.797±2.681 ^b	2.586±0.41 ^b
PBS + glutathione	402.0±27.22 ^c	5.734±0.63 ^a

It has to be noted that the *E. coli* strain used for the β -galactosidase activity was strain CECT 4201, due to the inability of strain BW25113 to produce this enzyme. Results obtained show that the presence of glutathione during heating preserved the activity of the two enzymes tested. The protection exerted by glutathione took place in the cell. However, it has to be remarked that we also observed that isolated β -galactosidase enzyme was stabilized by glutathione *in vitro* against heat inactivation (data not shown). It is reasonable to think that the thermostabilization of proteins and particular enzymes may play a role in cell survival, and perhaps in ulterior cellular processes involved in recovery of damages inflicted by heat.

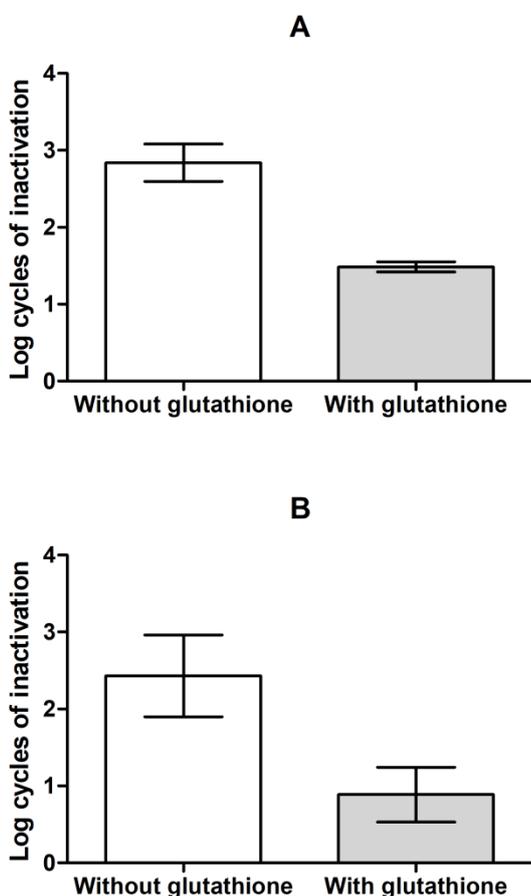


Figure 2. Log₁₀ cycles of inactivation of *Salmonella senftenberg* 775W (A) and *Lactobacillus plantarum* 748 (B) treated at 58°C for 20 and 6 minutes, respectively, in PBS with (grey bars) and without glutathione (white bars). Concentration of glutathione was 10 mM for *Salmonella* and 5 mM for *L. plantarum*.

A plausible explanation is that intracellular protein would be denatured due to the exposure to heat, thus becoming insoluble. Therefore, according to these results, cells heated in the presence of glutathione would retain a

Influence of the addition of glutathione in the treatment medium on *E. coli* ROS content, membrane permeabilization and protein aggregation.

In order to further explore the mechanisms of the protective effect of glutathione during heating, cells were heat treated (58°C/5 min) and the presence of ROS (DHE staining) and permanent permeabilization of the membrane (PI staining) after treatment were studied. Figure 3 includes the percentage of cells with a positive staining for DHE and for PI after heating. The figure shows that a notable lower percentage of cells showed staining when they had been heated in the presence of glutathione. Therefore, in addition to the thermo-protective effect on proteins, the presence of glutathione in the heating medium was related to a reduction in the intracellular ROS levels present after heating, and also to a stabilization of the membranes against the action of heat.

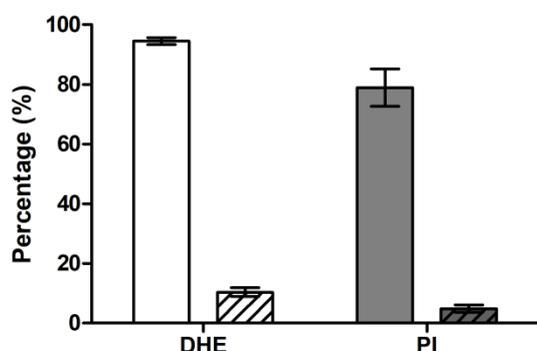


Figure 3. Percentage of cells stained with DHE (white bars) and PI (grey bars) after heating (58°C/5 min) in PBS with (stripped bars) and without glutathione (plain bars) added.

With the aim of further study the protective role of glutathione against protein denaturalization *in situ*, the formation of protein aggregates inside the cells was explored.

Figure 4 shows the microphotographs of cells heated in PBS without glutathione (4A) and with glutathione (4B). The presence, size and location of protein aggregates can be clearly observed by fluorescein fluorescence, even in phase contrast photographs. Cells treated without glutathione presented a higher amount of protein aggregates, which were of bigger size and more dispersed as compared to those in cells treated with glutathione. Govers and Aertsen (2015) proposed that the protein aggregate surface area exposed in the cytoplasmic milieu has cytotoxic effects, functionally interferes with or hinders essential cellular repair processes, and thus limits bacterial survival. These results are in accordance with those obtained with total soluble protein determinations, and with enzymatic activities (Table 1 and 2), and confirm the protective effect of glutathione against protein destabilization by heat exposure.

Sublethal injury and recovery after treatment.

The occurrence and repair of sublethally injured cells after treatment was studied through differential plate techniques, by the use of four different agars and two liquid media (Figure 5). In this case, cells were subjected to a mild heat treatment (58°C/1 min), with the aim of obtaining sublethally injured cells, to study their recovery. Cells were treated in the absence (5A, 5C) and presence (5B) of glutathione. Once treated, cells were suspended in liquid media for recovery (TSBYE in 5A and 5B and TSBYE+10 mM glutathione in 5C). Samples were withdrawn from the liquid medium after 0, 30, 60 and 120 min for plate count in non selective and in selective agars. Untreated cells (UT) were also plated in the different agars as a control. This experimental approach allows studying the occurrence and kinetics of recovery of cellular damages along time after treatment, assuming that cells unable to grow in TSAYE-NaCl and in TSAYE-BS correspond to sublethally injured viable cells with compromised cytoplasmic and outer membranes, respectively.

Plate counts immediately after heat treatment (time 0 in the graphs) showed that cells were partially inactivated and partially sublethally injured. The amount of inactivated and sublethally injured cells was higher for cell suspensions treated in the absence of glutathione (Fig 5A vs 5B). When cells were recovered in TSAYE (standard recovery conditions) 1.6 log cycles of inactivation were attained, plus 2 additional log cycles in TSAYE-NaCl and in TSAYE-BS. In Figure 5A it can be observed that injured cells started promptly to regain tolerance to NaCl, which was completely restored after 60 min incubation in TSBYE. This fact indicates that the functionality of the cytoplasmic membrane was quickly recovered. Restoration of tolerance to bile salts was slower, and 120 minutes were needed for full recovery of the selective permeability of the outer membrane.

The addition of glutathione to the heating medium (Fig 5B) caused a decrease in the inactivation degree, as expected (0.8 Log cycles). It also caused a drop in the amount of sublethally injured cells, which accounted only for an extra 0.5 log cycle. These results indicate that the presence of glutathione during heating caused a thermostabilization of the envelopes, and are in accordance with those obtained with PI staining (Fig 3).

Besides, it is worth noting that higher numbers of viable cells were detected in MM-Cys (minimal medium plus cysteine in anaerobic conditions) than in TSAYE (nutritionally complex medium). This effect can be more clearly observed for cells treated in PBS without glutathione (Fig. 5A). Some authors have already reported that minimal media may improve cell recovery, and this effect has been attributed to the fact that no traces of hydrogen peroxide are formed during autoclaving and storage, contrary to complex

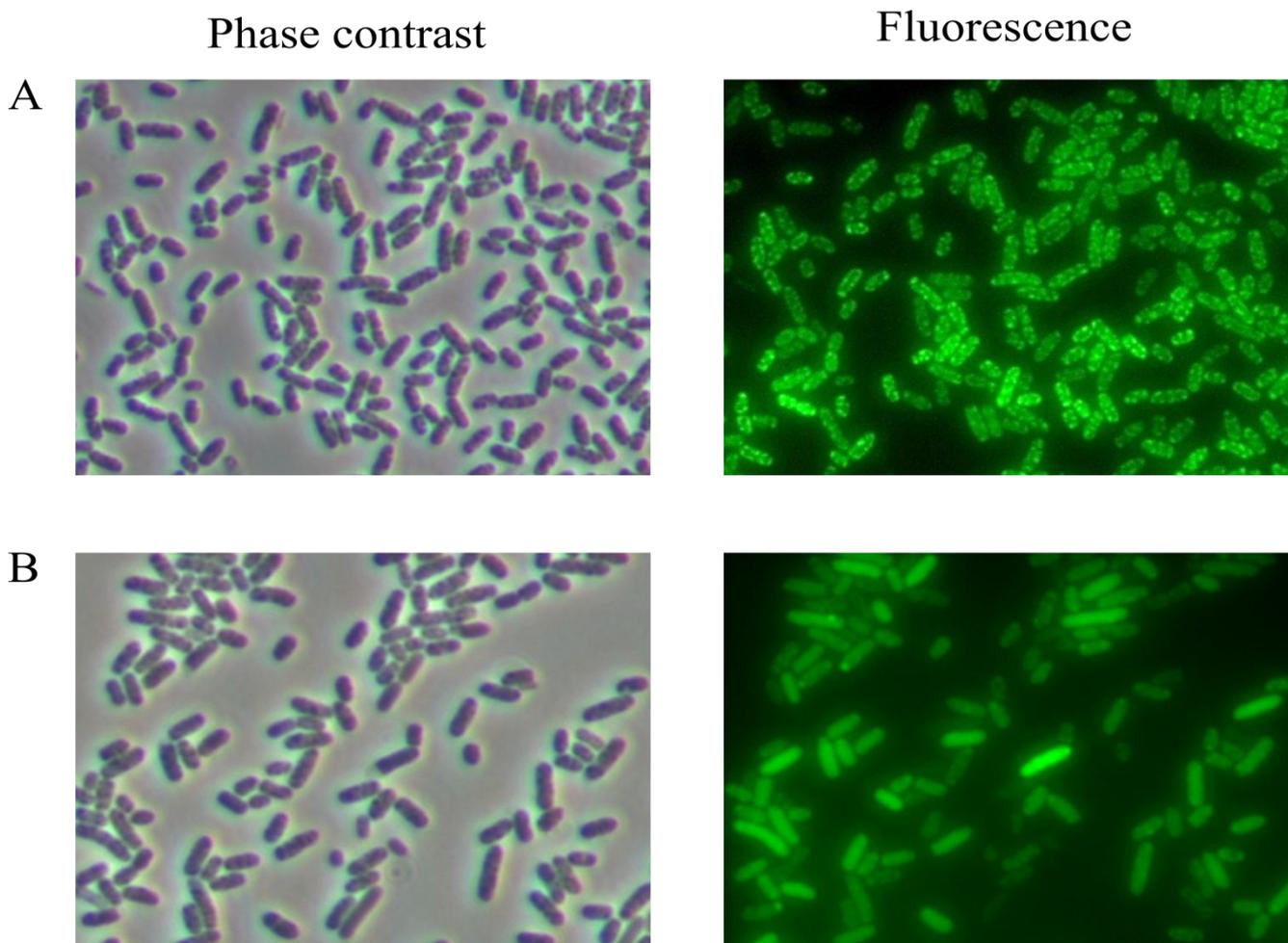


Figure 4. Protein aggregates in *E. coli* heat treated (58°C/10 min) in absence (A) or presence (B) of glutathione added.

medium (Mackey and Seymour, 1987). Besides, it is important to note that under these recovery conditions, the amount of surviving cells was very similar for cells heated in presence and in absence of glutathione in the heating medium. This result suggests that the protective effect of glutathione during heating could be related, at least to some degree, to cellular disorders that can be counteracted during the recovery period, if the environmental conditions are adequate. Membrane structural alterations would be included among these disorders, but other cellular alterations cannot be excluded.

Finally, comparison of Figures 5A and 5C allows evaluating the influence of the presence of glutathione in the liquid medium where cells were suspended for recovery. As it can be observed, kinetics of recovery of the cytoplasmic and the outer membrane, i.e. impermeability of NaCl and bile salts, respectively, was very similar in liquid media with or without glutathione. This fact would indicate that the presence of external glutathione would not improve membranes repair processes, at least during the 2-hour period here studied, and in the experimental conditions here tested.

Results presented in this investigation have shown that the presence of external glutathione protects bacterial cells against inactivation by heat exposure. This protection was observed on *E. coli*, *S. enterica* and *L. plantarum*, suggesting a general effect on cells of different types and physiology. We have demonstrated that in *E. coli* the presence of glutathione prevented damages and permeabilization in the membranes, caused a reduction in the intracellular level of ROS, and decreased the degree of protein aggregation inside the cytoplasm. In fact, glutathione caused a direct stabilization effect on enzymes against heat. All these cellular events could be involved in cell inactivation, and could be somehow interrelated. For instance, we can speculate that a damaged cytoplasmic membrane may be related to unbalances in the electron transport chain, thus giving rise to increased amounts of ROS level inside the cells (Stephens *et al.*, 2000; Imlay, 2015), which could be poorly controlled due to loss of activity of detoxifying enzymes, as we have demonstrated with SOD. Alternatively, a higher level of ROS and other toxic species, perhaps resulting from the loss of activity of protective enzymes, depletion of antioxidant molecules

and/or other mechanisms, may be the actual cause of secondary injuries in membranes, proteins and other cellular structures. Glutathione seemed to exert a protective effect at various cellular levels.

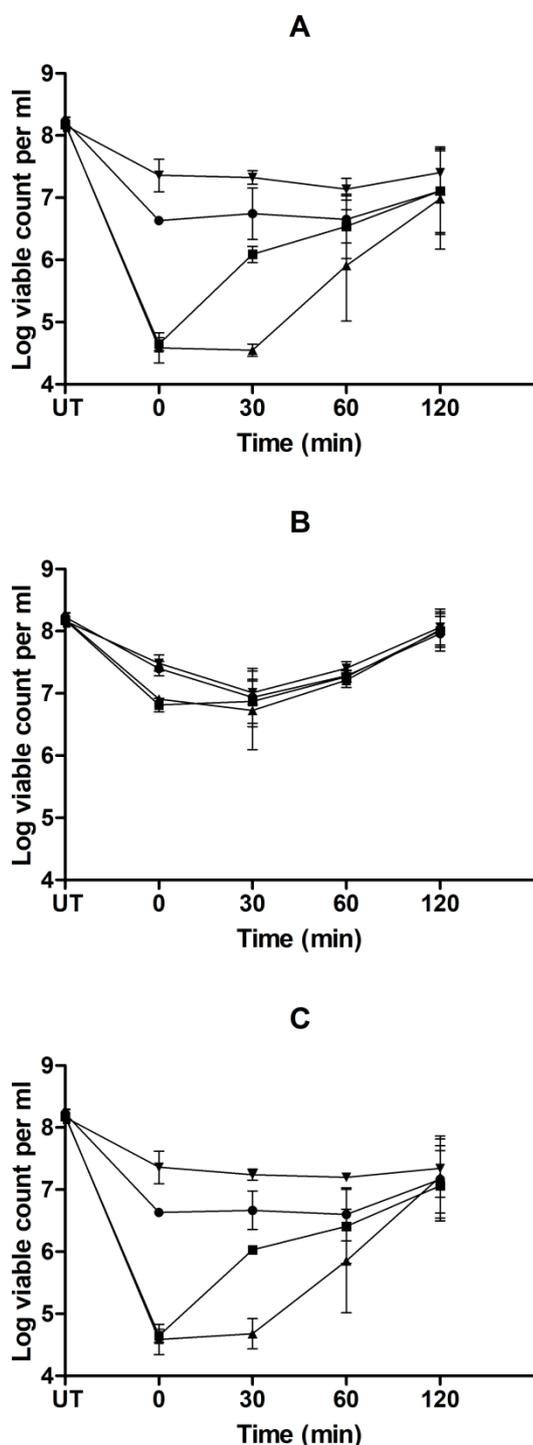


Figure 5. Repair of sublethally damaged cells of *E. coli* BW25113 after heat treatment (58°C/1 min) in: (A) absence of glutathione in treatment and recovery, (B) presence of glutathione in treatment and (C) presence of glutathione in recovery. Heated cells were suspended in liquid media (TSBYE) and removed for counting on TSAYE (●), TSAYE plus 4% sodium chloride (■), TSAYE plus 0.2% bile salts (▲) and minimum media plus 3% cysteine (▼). UT: untreated cells.

These results add new knowledge about bacterial inactivation and survival by stressing agents, in this case, heat. Besides, bacterial cell and protein and enzyme protection against the action of heat by glutathione may also be of interest to pharmaceutical and starter industries.

Acknowledgements

The authors would like to thank the European Regional Development Fund, MINECO-CICYT (projects AGL2012-33522; AGL2015-69565-P) and the Department of Innovation Research and University of the Aragón Government and European Social Fund (FSE) for the support (predoctoral grant M. Marcén, C093/2014).

REFERENCES

- Aertsen, A., De Spiegeleer, P., Vanoirbeek, K., Lavilla, M., Michiels, C.W., 2005. Induction of oxidative stress by high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2226-2231.
- Cabiscol, E., Tamarit, J., Ros, J., 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology* 3, 3-8.
- 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, 107.
- Fahey, R., Brown, W., Adams, W., Worsham, M., 1978. Occurrence of glutathione in bacteria. *Journal of Bacteriology* 133, 1126-1129.
- Fahey, R.C., 2013. Glutathione analogs in prokaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1830, 3182-3198.
- Farr, S.B., Natvig, D.O., Kogoma, T., 1985. Toxicity and mutagenicity of plumbagin and the induction of a possible new DNA repair pathway in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 164, 1309-1316.
- Gerhardt, P., 1994. *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology.
- Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J.L., 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 65, 45-80.
- Govers, S.K., Aertsen, A., 2015. Impact of high hydrostatic pressure processing on individual cellular resuscitation times and protein aggregates in *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology* 213, 17-23.
- Hassan, H.M., Fridovich, I., 1979. Intracellular production of superoxide radical and of hydrogen peroxide by redox active compounds. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 196, 385-395.
- Imlay, J.A., 2013. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nature reviews. Microbiology* 11, 443.
- Imlay, J.A., 2015. Diagnosing oxidative stress in bacteria: not as easy as you might think. *Current Opinion in Microbiology* 24, 124-131.
- Lederberg, J., 1950. The beta-d-galactosidase of *Escherichia coli*, strain K-12. *Journal of Bacteriology* 60, 381.
- Mackey, B., 2000. Injured bacteria, in: Lund, M., Baird-Parker, T. C., Gould, G. W., eds. (Ed.), *The Microbiological Safety and Quality of Food Vol. I*, Aspen Publisher: Gaithersburg, pp. 315-341.
- Mackey, B.M., Seymour, D.A., 1987. The effect of catalase on recovery of heat-injured DNA-repair mutants of *Escherichia coli*. *Microbiology* 133, 1601-1610.
- Marcén, M., Ruiz, V., Serrano, M.J., Condón, S., Mañas, P., 2017. Oxidative stress in *E. coli* cells upon exposure to heat treatments. *International Journal of Food Microbiology* 241, 198-205.

- Masip, L., Veeravalli, K., Georgiou, G., 2006. The many faces of glutathione in bacteria. *Antioxidants and Redox Signaling* 8, 753-762.
- Mols, M., Abee, T., 2011. Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*. *Environmental Microbiology* 13, 1387-1394.
- Mols, M., Van Kranenburg, R., Van Melis, C.C., Moezelaar, R., Abee, T., 2010. Analysis of acid-stressed *Bacillus cereus* reveals a major oxidative response and inactivation-associated radical formation. *Environmental Microbiology* 12, 873-885.
- Nguyen, H.T., Corry, J.E., Miles, C.A., 2006. Heat resistance and mechanism of heat inactivation in thermophilic campylobacters. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 908-913.
- Smelt, J., Brul, S., 2014. Thermal inactivation of microorganisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 54, 1371-1385.
- Smirnova, G., Oktyabrsky, O., 2005. Glutathione in bacteria. *Biochemistry* 70, 1199-1211.
- Stanier, R.Y., Villanueva, J.R., 1996. *Microbiología*. Reverté.
- Stephens, P., Druggan, P., Nebe-von Caron, G., 2000. Stressed *Salmonella* are exposed to reactive oxygen species from two independent sources during recovery in conventional culture media. *International Journal of Food Microbiology* 60, 269-285.
- Suh, J.-H., Knabel, S.J., 2000. Comparison of different reducing agents for enhanced detection of heat-injured *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 63, 1058-1063.

Role of glutathione on *E. coli* resistance to technologies of food preservation

ABSTRACT

Glutathione is considered as a potent antioxidant molecule with important roles in eukaryotic cells; however the role of intracellular glutathione in prokaryotes remains unclear. In this work, an *E. coli* strain lacking *gshA* gene and *E. coli* strain overexpressing *gshF* gene were constructed, to gain a deeper knowledge about the role of intracellular glutathione on cellular physiology. The parental and constructed strains, which showed a different intracellular concentration of glutathione, were exposed to a variety of sublethal growth conditions and no differences among strains were detected. They were also subjected to lethal treatments, including heat, high hydrostatic pressure (HHP), pulsed electric fields (PEF) and acidity, and the inactivation attained was determined and compared. No differences in growth capacity were detected among strains, PEF and HHP survival. On the contrary, the presence of higher concentrations of intracellular glutathione increased resistance to acid and, most notably, to heat treatment. The higher thermal resistance of the strain with higher glutathione concentration, *E. coli-gshF*, was related to lower levels of ROS and membrane permeabilization after treatment.

INTRODUCTION

Food preservation means exposing microorganisms to hostile conditions in order to inhibit their growth or lead to their inactivation. Microorganisms are able to trigger different responses to survive in these hostile environments, many of which are aimed to maintain some homeostatic parameters. Homeostasis implies to maintain the internal cell conditions constant even when these cells are subjected to wide environmental changes. These conditions include internal pH, proton motive force, osmotic pressure and redox potential, among others (Leistner, 2000; Wood, 2011). In the last years, the maintenance of an adequate redox balance is gaining attention among researchers and it is being considered as essential for microbial survival. Cells have to maintain a balance between prooxidant and antioxidant substances inside the cell, since a high level of prooxidant substances could produce damages in proteins, lipids, carbohydrates and nucleic acids (Storz and Zheng, 2000). Therefore, cells present some enzymatic and non-enzymatic systems to neutralize oxidant compounds and/or to repair oxidative damages. Superoxide dismutases, catalases, hydroperoxidases, thioredoxine and glutathione systems are some of these protective systems (Imlay, 2013; Smirnova *et al.*, 2016).

Glutathione (γ -glutamyl-cysteinyl-glycine; GSH) is the most abundant low-molecular-weight thiol, and GSH/glutathione disulfide (GSSG) is the major redox couple in eukaryotic cells. The biological function of glutathione in eukaryotes is still under study, however it is generally acknowledged that it is involved in a variety of essential cellular processes including nutrient metabolism, regulation of gene expression, DNA and protein synthesis, cell proliferation and apoptosis, signal transduction,

cytokine production and immune response, etc. Glutathione contributes to counteract oxidative stress, in such a way that its deficiency plays a role in aging and pathogenesis of many diseases (Wu *et al.*, 2004). Although glutathione is present in all eukaryotic cells, in prokaryotes is found in most gram-negative bacteria, but only scarcely in gram-positive bacteria. Recent studies are showing that most gram-positive bacteria possess systems to either synthesize or transport glutathione, and in some cases glutathione analogues are present (Pophaly *et al.*, 2012; Fahey, 2013). Glutathione is synthesized in cells via two sequential reactions catalyzed by γ -glutamyl-cysteine synthetase, encoded by *gshA* gene, and GSH-synthetase, encoded by *gshB* gene. Another enzyme, a bifunctional glutathione synthetase encoded by *gshF* gene, has been described in some microorganisms including *L. monocytogenes*, *S. agalactiae*, *E. faecalis* and *S. thermophilus* (Wang *et al.*, 2016a; Wang *et al.*, 2016b). Cells need to maintain a suitable ratio between oxidized and reduced glutathione (GSH/GSSG) since GSSG is highly toxic for cells due to its high reactivity with free sulfhydryl groups. In *E. coli* cells, for instance, 99.5 % of glutathione exists in the reduced form (Smirnova and Oktyabrsky, 2005). This is mainly controlled by the action of the enzyme glutathione reductase, a NADP-dependent enzyme, although alternative pathways for GSSG reduction exist within bacterial cells.

However the exact physiological role of glutathione in prokaryotes remains unclear. Throughout the years, scattered studies have shown that glutathione, a non-essential metabolite in bacteria, could play a role in protecting microorganisms against different environmental stresses. These include osmotic shock, acidity, toxins and antibiotics, radiation stress, or direct oxidative agents (Ferguson and Booth, 1998; Carmel-Harel and Storz, 2000;

Smirnova and Oktyabrsky, 2005; Masip *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007; Pophaly *et al.*, 2012; Smirnova *et al.*, 2016). As an example, Margalef-Català *et al.* (2016) observed a protective effect of externally added glutathione on *Oenococcus oenis* against acid pH and ethanol. For this reason the addition of external glutathione has been proposed as a method to increase cell survival in industrial starters and in food fermentation environments (Wang *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016b). In a previous study carried out in our laboratory, we demonstrated that the addition of glutathione to the heating medium protected *E. coli* against inactivation (Marcén *et al.*, 2017). Despite the practical utility of the observations regarding the effect of externally added glutathione, these conclusions may not be extended to cells in their physiological state, where glutathione is synthesized inside the cytoplasm.

The aim of this study is to provide new information about the physiological role of glutathione in prokaryotes, and in particular, in the survival to food-related stresses. For this purpose, we designed and constructed an *E. coli* strain lacking *gshA* gene, and an *E. coli* strain overexpressing *gshF* gene, in order to obtain cells with different intracellular glutathione content, to compare with the parental strain. Their growth capacity under several environmental conditions and their survival capacity to different stresses related to food processing (heat, high hydrostatic pressure, pulsed electric fields and acidity) was studied, and mechanisms involved in the protective effect against heat were explored.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. *Escherichia coli* MG1655 and its derivatives were used in this study. The strains were stored at -80°C. To prepare precultures, flasks containing 10 mL of TSBYE (Tryptic Soy Broth with 0.6% Yeast Extract, Oxoid, Basingstoke, UK) were inoculated with one single colony from a TSAYE plate (Tryptic Soy Agar with 0.6% Yeast Extract, Oxoid). The precultures were incubated overnight at 37°C, under agitation. Subsequently, cultures were obtained by inoculating a flask with 50 ml of broth with 100 µL of the preculture, and incubation at 37°C under agitation, until stationary phase of growth was reached after 18-24 hours incubation (2×10^9 cfu/ml, approximately).

Strain and plasmid construction. An *E. coli* MG1655 $\Delta gshA$ strain (lacking the *gshA* gene encoding the γ -glutamyl-cysteine ligase) was constructed following the procedure described by Datsenko and Wanner (2000), with the aim of disrupting the glutathione synthesis pathway. Briefly, an amplicon containing the kanamycin resistance cassette flanked by FRT sites was prepared on the plasmid pKD13 using the primers described by Baba *et al.* (2006) and transformed by electroporation in a recombination-proficient *E. coli* MG1655 strain (equipped with the plasmid pKD46, which encodes the λ red recombinase genes under the *araBAD* promoter). Subsequently, the kanamycin cassette was removed by transiently equipping the strain with the plasmid pCP20 (expressing the Flp site-specific recombinase) (Cherepanov and Wackernagel, 1995). The chromosomal deletion was verified by PCR and sequencing (Macrogen, Amsterdam, The Netherlands) using the locus specific primers 5'-GGCACTAATGTAGGCCTGC-3' and 5'-CCCAGGCGAGTCTGAGTATA-3'.

Additionally, a strain of *E. coli* MG1655 overexpressing gene *gshF*, encoding the glutathione biosynthesis bifunctional enzyme GshF, was constructed, in order to obtain *E. coli* cells with a high amount of intracellular glutathione. The *gshF* open reading frame, together with its corresponding promoter region, were amplified from *Listeria monocytogenes* ScottA, by colony PCR (Thermo Scientific Phusion™ DNA polymerase, Waltham, USA), using the following 5'-phosphorylated primers: 5'ATTAACGCGGTAATCTCCCC-3' and 5'-ATGGAACCGGCGATTATTCG-3'. The amplicon was subsequently cloned into pACYC184 (Rose, 1988) which was cut open with EcoRV (Thermo Scientific). The plasmid harboring the *gshF* gene with its native promoter (designated pACYC184-*gshF*) was electroporated into *E. coli* MG1655 and the insertion was confirmed by PCR and sequencing using the *gshF* gene (5'-GGCTTCCATTCAGGTCGAGG-3' and 5'-CGTGTATGAAATCTAACAAATGCG-3) specific primers.

For strain construction, Lysogeny Broth (LB) medium (Miller, 1992) was used and when necessary, a concentration of 50 µg/ml of kanamycin (Panreac-AppliChem, Darmstadt, Germany), 100 µg/ml of ampicillin (Fischer Scientific, Pittsburgh, PA, USA) or 30 µg/ml of chloramphenicol (Sigma-Aldrich) was added to select for the presence of recombinant amplicons, pKD46 and pCP20 (Cherepanov and Wackernagel, 1995; Datsenko and Wanner, 2000) or pACYC184-based vectors (Rose, 1988), respectively. Constructed strains were designated MG1655-*gshA* and MG1655-*gshF*.

Determination of intracellular glutathione. The intracellular glutathione was determined in *E. coli* MG1655, *E. coli* MG1655-*gshA* and *E. coli* MG1655-*gshF* cells grown to stationary phase. In all cases, cells were washed three times in PBS by centrifugation, concentration was adjusted to 10^8 cells/mL, and cells were lysed with 0.1 µm glass beads with a bead-beater instrument (BioSpec product, Oklahoma, USA). 5 cycles of 10 seconds were applied, and samples were cooled on ice between cycles. After this, the level of lysis was checked through microscopic examination with aim of achieving, at least, 95% of cells lysed. Lysed samples were centrifuged and the supernatant (soluble fraction) was reserved for analysis of glutathione and protein content. Glutathione was determined with a commercial kit (Glutathione Assay Kit, Sigma-Aldrich), based on the determination of soluble thiol groups (Ellmman's reactive), using the enzyme glutathione reductase to recycle oxidized glutathione.

Growth curves. Bacterial growth was carried out in 96 well microtiter plates (Sigma Aldrich), which contained 190 µL of liquid media inoculated with 10 µL of preculture, previously incubated overnight at 37°C under agitation. Liquid media was either TSBYE or minimal medium M9 salts-glucose, with or without the addition of several inhibitory compounds (NaCl, FeSO₄, AgNO₃ (Panreac), CuCl₂, H₂O₂, Paraquat, Plumbagin, Ampicillin and Enrofloxacin (Sigma Adrich)), or under different environmental conditions (Temperature, pH and a_w). Microtiter plates were incubated at the desired temperature and atmosphere, and the absorbance at 620 nm was measured throughout 24-48 hours in a spectrophotometer (Labsystems Multiskan MS, Thermo Scientific). To obtain growth curves absorbance vs time (hours) was represented.

Heat treatment. Heat treatments were carried out in glass tubes, which contained 4.5 mL of sterile PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma, San Louis, USA) submerged in a thermostated water bath. Once the PBS reached the desired temperature ($\pm 0.1^\circ\text{C}$), it was inoculated with 0.5 mL of the microbial cell suspension to obtain a initial concentration of $\geq 10^8$ cells/mL. After inoculation 0.1 mL samples were collected at different heating times, immediately plated and incubated for survival counting.

Pulsed electric field treatment. PEF equipment used in this investigation was supplied by ScandiNova (Modulator PG, ScandiNova, Uppsala, Swedwn). For PEF treatments cells were dissolved in McIlvaine buffer with pH 7.0 and 1mS/cm of conductivity until a concentration of $\geq 10^8$ cells/mL. They were introduced in the chamber of the PEF equipment (Modulator PG, ScandiNova, Uppsala, Sweden) which had a gap of 0.25

cm. A square pulse with amplitude of 5 μ s, a frequency of 0.5Hz, electric field strength of 20 kV/cm and 40°C of temperature were used during the treatment. After a treatment of different number of pulses samples were collected, immediately plated and incubated for survival counting.

High hydrostatic pressure. Stansted Fluid Power S-FL-085-09-W (Harlow, London, England) equipment was used to carry out HHP treatments. After centrifuging and diluting a cell concentration of $\geq 10^8$ cells/ml in PBS, every sample was packed in plastic bags (Coimbra Pack, S.L., Zaragoza, Spain) to introduce them in the equipment. Treatments consisted in applying a pressure of 300 MPa during different treatment times. Treated samples were collected, immediately plated and incubated for survival counting.

Acidity treatment. TSBYE acidified through addition of lactic acid (Panreac S.A, Barcelona, Spain) until pH 3 was used to treat a cell concentration of $\geq 10^8$ cells/ml. These treatments were carried out in sterilize tubes accommodated at 25°C. After different treatment times cells were collected, immediately plated and incubated for survival counting.

Recovery after treatments. After each treatment, plates were incubated at 37°C in aerobic conditions and after 24-72 h colony forming units were counted. Cells were not only recovered in TSAYE but also in minimal M₉ glucose-salts agar enriched with 3 mM L-cysteine HCl (Sigma Aldrich, Milan, Italy) under anaerobic atmosphere (MACS VA500 Microaerophilic Workstation, DW Scientific, UK) to create a low-oxidative stress environment in order to improve the recovery of cells (Suh and Knabel, 2000; Marcén *et al.*, 2017).

Results were expressed as the log₁₀ cycles of inactivation, calculated from Log N_t/N₀, after a fixed treatment time (minutes in heat, HHP and acid treatments and μ s in PEF treatment). All the experimental determinations were carried out at least 3 times with independent microbial cultures, and graphs show the average and the mean standard deviation (error bars).

ROS determination. The presence of ROS in cells was studied through staining with DHE (dihydroethidium). Treated cells were stained in a cell concentration of approximately 10⁸ cells/ml, incubated with the fluorescent dye, then centrifuged and resuspended in filtered PBS (0.22 μ m). A positive (plumbagin-treated cells) and a negative control (native cells) were always included. Staining conditions were 50 μ M/90 minutes for DHE (Patsoukis *et al.*, 2005; Mols *et al.*, 2009; Klotz *et al.*, 2010). The results obtained were observed by fluorescence microscopy (Nikon Eclipse E400 phase contrast and fluorescence microscope (Nikon Corporation, Japan)), in order to obtain the percentage of stained cells. Images were obtained with a high resolution camera (AxioCam MRc, Zeiss, Germany) and processed with the software ZEN 2012 (Zeiss, Germany). Total and fluorescent cells were counted from photographs taken from each sample.

All the staining experiments were carried out at least in duplicate with independent bacterial cultures and graphs show the average and the mean standard deviation (error bars).

Membrane permeabilization. Membrane permeabilization after treatment was studied by staining cells with propidium iodide (PI, 3 μ M/30 min), following a similar protocol which has been described for DHE and HPF. If cells had permeabilized membranes they allow the entrance of the dye producing an intense red fluorescence.

Statistical analysis. All the experimental determinations were performed 2-3 times with independent microbial cultures, unless indicated in the text, and data in figure correspond to the average and the mean standard deviation (error bars). Student's *t* tests were carried out using the GraphPad PRISM 5 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA), and differences were considered significant for $p \leq 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Intracellular glutathione in the constructed strains of *E. coli*

With the purpose of studying the effect of intracellular glutathione synthesized by cells on stress resistance, a mutant strain lacking the *gshA* gene and a strain overexpressing *gshF* gene were constructed from the parental strain MG1556. The GshF enzyme does not respond to feedback inhibition by excess glutathione, contrary to GshA enzyme, and thus it has been proposed as an adequate strategy for glutathione overproduction (Wang *et al.*, 2016a; Zhang *et al.*, 2016). The strains were constructed, and it was checked that the growth was equal under standard conditions, i.e. complex media and aerobic conditions. The concentration of glutathione inside cells, in stationary phase of growth was determined. Results are included in Table 1.

Table 1. Concentration of glutathione inside cells of *E. coli* MG1655, *E. coli* MG1655- Δ *gshA* and *E. coli* MG1655-*gshF* in stationary phase of growth.

	glutathione (nM/mL)
<i>E. coli</i> MG1655 WT	25.99 \pm 0.41 ^a
<i>E. coli</i> MG1655- Δ <i>gshA</i>	0 ^b
<i>E. coli</i> MG1655- <i>gshF</i>	33.91 \pm 0.55 ^c

* Different letters indicate statistical differences ($p > 0.05$)

The amount of glutathione produced by the Δ *gshA* mutant strain was under the detection limit of the analytical technique (<3.125 nM/mL), and can be considered as null. The amount of glutathione produced by *E. coli* MG1655-*gshF* was 31% higher than that of *E. coli* MG1556. These results demonstrated that the aim of obtaining cells with a different production of intracellular glutathione ($p < 0.05$) from the same wild-type strain had been achieved.

Effect of glutathione content on growth under stressing conditions

In order to further study the physiological role of glutathione on *E. coli* cells, the three strains were grown under different environmental conditions and growth curves obtained through absorbance measurements and compared. Table 2 shows the totality of conditions studied, which included complex and minimal media, pHs from 4.0 to 9.0, different concentrations of oxidant compounds, temperatures from 30 to 45°C, water activities from 0.99 to

0.94, heavy metals, etc.

No differences in growth were observed among the strains, thus we conclude that growth capacity was not affected by intracellular glutathione concentration, under the conditions here studied.

Effect of glutathione content on cellular survival to processing technologies

Figure 1 shows the Log₁₀ cycles of inactivation for each strain submitted to heat (58°C/5 min), HHP (500 MPa/5 min), PEF (30kV/cm/150 μs) and acidity treatment (pH 3.0/60 min). The mutant strain *E. coli* Δ*gshA* presented a slightly higher inactivation than the wild type strain to heat treatment (1A), HHP (1B) and acidity (1D); however this effect was not statistically significant ($p > 0.05$). Simultaneously, the *E. coli* strain overexpressing the *gshF* gene, presented a lower inactivation than *E. coli* MG1566 and the Δ*gshA* mutant to heat ($p \leq 0.001$) and to acidity ($p \leq 0.05$).

Table 2. Environmental conditions used to grow the three strains of *E. coli*.

Conditions	
pHs	4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0
aw	0.94, 0.96, 0.98, 1
NaCl	1, 2, 4, 6%
Temperature	30, 37, 45°C
H ₂ O ₂	0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 mM
Paraquat	0, 0.01, 0.1, 1, 10 mM
Plumbagin	0, 0.05, 0.5 μM
Ampicillin	0, 2, 5, 10, 15 μg/mL
Enrofloxacin	0, 1, 3, 5, 7 μg/mL
FeSO ₄	0, 2, 5, 10, 15 mg/L
CuCl ₂	0, 2, 5, 10, 15 mg/L
AgNO ₃	0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5%

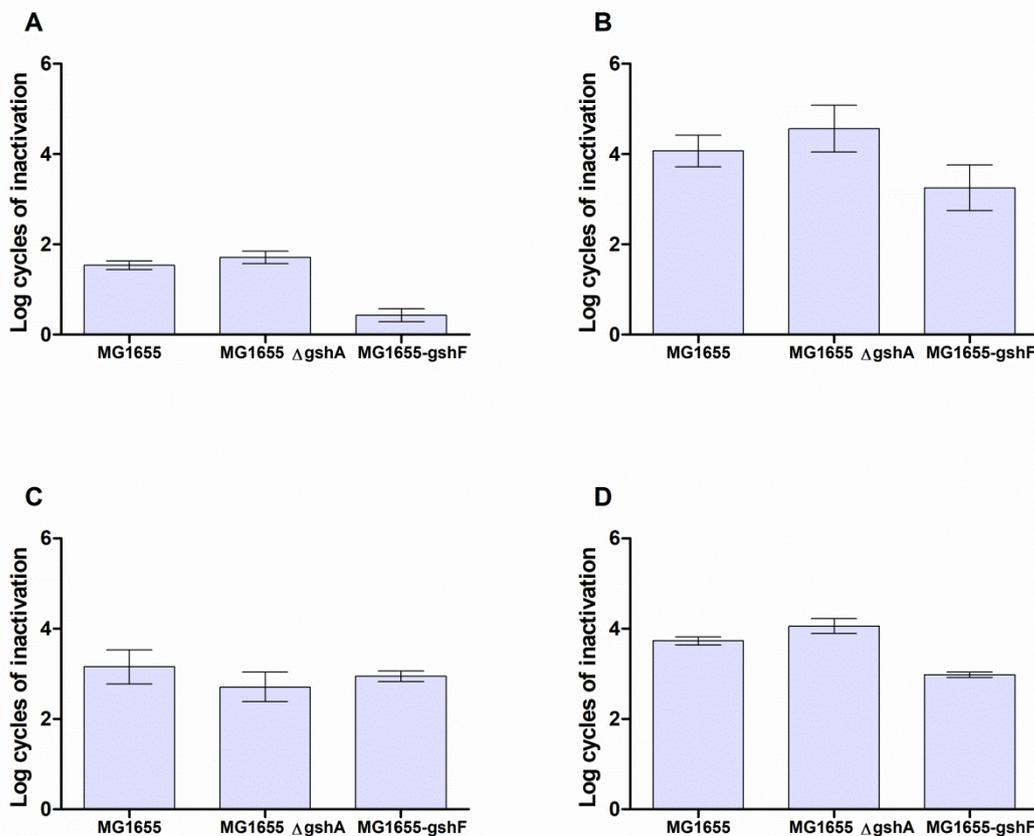


Figure 1. Log₁₀ cycles of inactivation of *E. coli* MG1655 (WT), *E. coli* MG1655-Δ*gshA* and *E. coli* - MG1655-*gshF* (pACYC184-*gshF*) treated by heat (58°C/5 min) (1A), HHP (500 MPa/5 min) (1B), PEF (30kV/cm/150 μs) (1C) and acidity (pH3/60 min) (1D).

These results indicate that the presence of higher levels of intracellular glutathione exerted a protective role against inactivation by heat and acidity, but not to HHP and PEF. Besides, it is noteworthy that the complete lack of intracellular glutathione (strain *E. coli* MG1566 $\Delta gshA$) did not influence cell survival to these technologies, under the experimental conditions here used. These results would indicate that the protective effect of intracellular glutathione, if any, did not increase linearly with its concentration.

The lack of a significant protective effect of intracellular glutathione on *E. coli* survival to HHP was unexpected, since it has been previously demonstrated that HHP induces oxidative stress in cells, and a high degree of protein aggregation (Mackey and Mañas, 2008), events that theoretically could be counteracted by the presence of glutathione. In order to gain insight into this behavior, the survival of *E. coli* MG1655 WT to HHP in media with growing concentrations of externally added glutathione was evaluated. Experiments were also performed with heat treatments for comparison purposes. Fig 2 illustrates the protective or sensitizing effect. As it can be observed in the Figure, externally added glutathione protected *E. coli* MG1655 WT against heat inactivation up to a certain threshold. However, in the case of HHP, glutathione did not protect cells, but, on the contrary, it sensitized cells in a concentration-dependent manner. It is reasonable to think that the final effect on survival observed may depend not only on the presence of glutathione, but also on the activity of the enzymes involved in the maintenance of GSH/GSSG ratio inside the cells, mainly glutathione reductase, whose activity may be affected by heat and by HHP in a different magnitude. Besides, the interaction between the thiol group in glutathione and the proteins in the cytoplasm may be completely different in cells treated by heat or by HHP, since these two agents interact differently with proteins. In addition, it has been demonstrated that thiol-reactive natural antimicrobial compounds increase the lethality of HHP treatments on several bacteria, in a synergic fashion. These results can explain data obtained with the mutant strains (Fig 1), in such a way that the final effect observed is the result of a compendium of different events taking place in the cells.

Mechanisms involved in protection against heat by intracellular glutathione: ROS content, membrane permeabilization and sublethal injury recovery.

It appears from previous results that glutathione exerted a most notable influence when cells were exposed to lethal conditions of high temperature and acidity, and not to sublethal conditions (table 2).

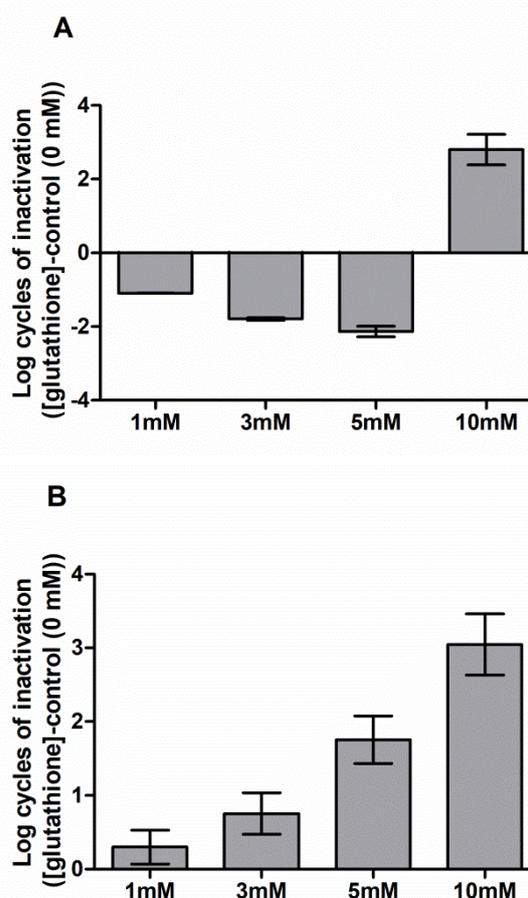


Figure 2. Effect of different concentrations of glutathione (1, 3, 5, 10 mM) in the inactivation of *E. coli* MG1655 treated with heat (58°C/15 min) (A) and with HHP (500 MPa/15 min) (B). Results represent the difference between the Log₁₀ cycles of inactivation to each concentration and the Log₁₀ cycles of inactivation of the control treatment (0 mM of glutathione).

Moreover, the protective effect was more notable for heat treatment than for acid treatment, in terms of magnitude and statistical significance. In order to gain insight into the mode of action of intracellular glutathione against heat inactivation, cells were heat treated (58°C/5 min) and subsequently the response to staining with DHE, to detect ROS including superoxide anions, and to PI, to detect membrane permeabilization was studied.

Figure 3 shows the percentage of fluorescent cells of the different strains, wild type *E. coli* MG1655, *E. coli* MG1655 $\Delta gshA$, and *E. coli* MG1655-*gshF*, stained with each dye.

Results showed that the strain MG1655-*gshF*, exhibited a lower level of ROS and membrane permeabilization to PI ($p \leq 0.05$), whereas almost no differences were observed for the wild type strain and the *gshA* mutant. Therefore, the presence of a higher level of intracellular glutathione provoked a reduction in the amount of ROS present after heating, and also stabilized the cytoplasmic membrane against the action of heat. These cellular events could be related to cell survival against heat exposure.

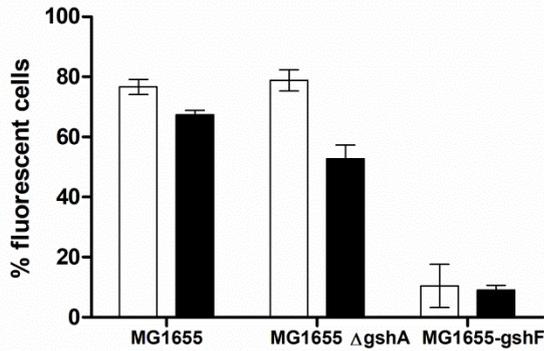


Figure 3. Percentage of cells stained with DHE (white bars) and IP (black bars) after treating the different strains by heat (58°C/5 min): *E. coli* MG1655 (WT), *E. coli* MG1655 Δ gshA and *E. coli* MG1655-gshF.

Figure 4 shows the bacterial counts obtained for the three strains treated at 58°C in two different recovery conditions, including standard conditions (TSAYE, aerobiosis) and minimal medium plus cysteine under anaerobic atmosphere, which represents a lower oxidative burden for stressed cells. Data corresponding to 5 min and 10 min treatments have been included. Two important observations can be drawn from the figure. Firstly, recovery of heated cells was greatly improved in MM-cys-anaerobiosis, at least for the wild type and the Δ gshA strains. This effect was more notable in the longer treatment applied, 10 min. Secondly, differences in survival among strains disappeared when cells were recovered in MM-cys-AN.

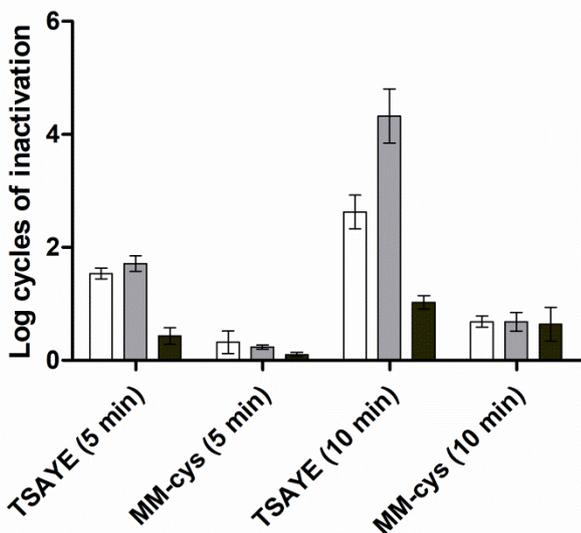


Figure 4. Log₁₀ cycles of inactivation of *E. coli* MG1655 (white bars), MG1655 Δ gshA (grey bars) and MG1655-gshF (black bars) treated by heat (58°C/ 5 and 10 min). Cells were recovered in TSAYE and MM-cys anaerobiosis.

These results were confirmed with longer treatments times which attained a higher level of lethality (20 min, data not shown). According to these results, the protective effect of intracellular glutathione against heat inactivation was

equivalent to the recovery under oxidative gentle conditions. In other word, the lack of high levels of glutathione in bacterial cells would be circumvented by cellular mechanisms aimed to repair those cellular structures or functions effectively stabilized in strain MG1655-gshF.

CONCLUSIONS

In this work, through the use of genetically manipulated strains, we have demonstrated that a higher concentration of intracellular glutathione protects *E. coli* cells against the inactivation by acid and particularly by heat exposure. The levels of glutathione attained by the strain harboring the *gshF* gene did not exert an influence on survival to HHP and PEF, and on growth capacity under a variety of stressing conditions. Intracellular glutathione was related to a more thermostable membrane, and to lower levels of ROS inside cells after heating. Recovery after heating under oxidative gentle conditions greatly improved *E. coli* survival in the strains with lower glutathione concentrations, and seemed to mimic the protective effect of the presence of increased intracellular glutathione during the treatment.

Acknowledgements

The authors would like to thank the European Regional Development Fund, MINECO-CICYT (projects AGL2012-33522; AGL2015-69565-P) and the Department of Science, Technology and University of the Aragon Government and European Social Fund (FSE) for the support (predoctoral grant M. Marcén).

REFERENCES

- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., Mori, H., 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology* 2.
- Carmel-Harel, O., Storz, G., 2000. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annual Reviews in Microbiology* 54, 439-461.
- Cherepanov, P.P., Wackernagel, W., 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with the option of F1p-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158, 9-14.
- Datsenko, K.A., Wanner, B.L., 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 6640-6645.
- Fahey, R.C., 2013. Glutathione analogs in prokaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1830, 3182-3198.
- Ferguson, G.P., Booth, I.R., 1998. Importance of glutathione for growth and survival of *Escherichia coli* cells: detoxification of methylglyoxal and maintenance of intracellular K⁺. *Journal of Bacteriology* 180, 4314-4318.
- Imlay, J.A., 2013. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nature reviews. Microbiology* 11, 443.

- Klotz, B., Mañas, P., Mackey, B.M., 2010. The relationship between membrane damage, release of protein and loss of viability in *Escherichia coli* exposed to high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology* 137, 214-220.
- Leistner, L., 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* 55, 181-186.
- Mackey, B.M., Mañas, P., 2008. Inactivation of *Escherichia coli* by high pressure, High-pressure microbiology. *American Society of Microbiology*, pp. 53-85.
- Marcén, M., Ruiz, V., Serrano, M.J., Condón, S., Mañas, P., 2017. Oxidative stress in *E. coli* cells upon exposure to heat treatments. *International Journal of Food Microbiology* 241, 198-205.
- Margalef-Català, M., Araque, I., Weidmann, S., Guzzo, J., Bordons, A., Reguant, C., 2016. Protective role of glutathione addition against wine-related stress in *Oenococcus oeni*. *Food Research International* 90, 8-15.
- Masip, L., Veeravalli, K., Georgiou, G., 2006. The many faces of glutathione in bacteria. *Antioxidants and Redox Signaling* 8, 753-762.
- Mols, M., Pier, I., Zwietering, M.H., Abee, T., 2009. The impact of oxygen availability on stress survival and radical formation of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology* 135, 303-311.
- Patsoukis, N., Papapostolou, I., Georgiou, C.D., 2005. Interference of non-specific peroxidases in the fluorescence detection of superoxide radical by hydroethidine oxidation: a new assay for H₂O₂. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381, 1065-1072.
- Pophaly, S.D., Singh, R., Pophaly, S.D., Kaushik, J.K., Tomar, S.K., 2012. Current status and emerging role of glutathione in food grade lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories* 11, 114.
- Rose, R.E., 1988. The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucleic Acids Research* 16, 355-355.
- Smirnova, G., Muzyka, N., Lepekhina, E., Oktyabrsky, O., 2016. Roles of the glutathione-and thioredoxin-dependent systems in the *Escherichia coli* responses to ciprofloxacin and ampicillin. *Archives of Microbiology* 198, 913-921.
- Smirnova, G., Oktyabrsky, O., 2005. Glutathione in bacteria. *Biochemistry* 70, 1199-1211.
- Storz, G., Zheng, M., 2000. Oxidative stress in: Storz, G., Henнге-Aronis, R., eds. (Ed.), *Bacterial Stress Responses*, AMS Press. Wasington D.C., pp. 47-59.
- Suh, J.-H., Knabel, S.J., 2000. Comparison of different reducing agents for enhanced detection of heat-injured *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 63, 1058-1063.
- Wang, D., Wang, C., Wu, H., Li, Z., Ye, Q., 2016a. Glutathione production by recombinant *Escherichia coli* expressing bifunctional glutathione synthetase. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 43, 45-53.
- Wang, T., Lu, W., Lu, S., Kong, J., 2015. Protective role of glutathione against oxidative stress in *Streptococcus thermophilus*. *International Dairy Journal* 45, 41-47.
- Wang, T., Xu, Z., Lu, S., Xin, M., Kong, J., 2016b. Effects of glutathione on acid stress resistance and symbiosis between *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *International Dairy Journal* 61, 22-28.
- Wood, J.M., 2011. Bacterial osmoregulation: a paradigm for the study of cellular homeostasis. *Annual Review of Microbiology* 65, 215-238.
- Wu, G., Fang, Y.-Z., Yang, S., Lupton, J.R., Turner, N.D., 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of Nutrition* 134, 489-492.
- Zhang, J., Fu, R.Y., Hugenholtz, J., Li, Y., Chen, J., 2007. Glutathione protects *Lactococcus lactis* against acid stress. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5268-5275.
- Zhang, J., Quan, C., Wang, C., Wu, H., Li, Z., Ye, Q., 2016. Systematic manipulation of glutathione metabolism in *Escherichia coli* for improved glutathione production. *Microbial Cell Factories* 15, 38.

4.5 Exploración del efecto de la recuperación en medio mínimo en la termorresistencia de los esporos de *B. subtilis*

Tal y como se deduce de los capítulos previos, la siembra de supervivientes en medio mínimo enriquecido con cisteína e incubado en anaerobiosis favorecía la recuperación de *E. coli*. La explicación más plausible de este efecto es que la disminución del nivel de estrés oxidativo, debido a su menor potencial redox y a la ausencia de peróxido de hidrógeno y otras ROS generadas durante el autoclavado del medio de recuperación, facilitarían la reparación de los daños infringidos por las distintas tecnologías. Por ello, y dada la gran importancia del control de las especies esporuladas para la industria alimentaria, se decidió explorar los fenómenos de daño y reparación celular en esporos tratados térmicamente. La metodología seleccionada para esta exploración fue comparar los recuentos obtenidos en un medio complejo, -agar nutritivo-, y en un medio mínimo con adición de cisteína -MM-cys-.

Para el estudio se utilizó una suspensión de esporos de *B. subtilis* obtenida a 30°C en medio líquido, tal y como se describe en Material y Métodos. En primer lugar se caracterizó la termorresistencia de los esporos de *B. subtilis* tratados térmicamente en medios de pH 7,0 y 4,0, bajo condiciones de recuperación de referencia (AN, 37°C, aerobiosis). Los resultados se muestran en la Figura 4.7.1. Como se observa en la figura las gráficas de supervivencia mostraban hombros, lo que obligó a modelizar las curvas con la ecuación de Geeraerd, por las razones discutidas en capítulos anteriores. Los parámetros de la modelización se incluyen en la tabla 4.7.1. Los tiempos de reducción decimal estimados están dentro del rango de los publicados previamente por otros autores (Palop, 1995; Condón y col., 1996).

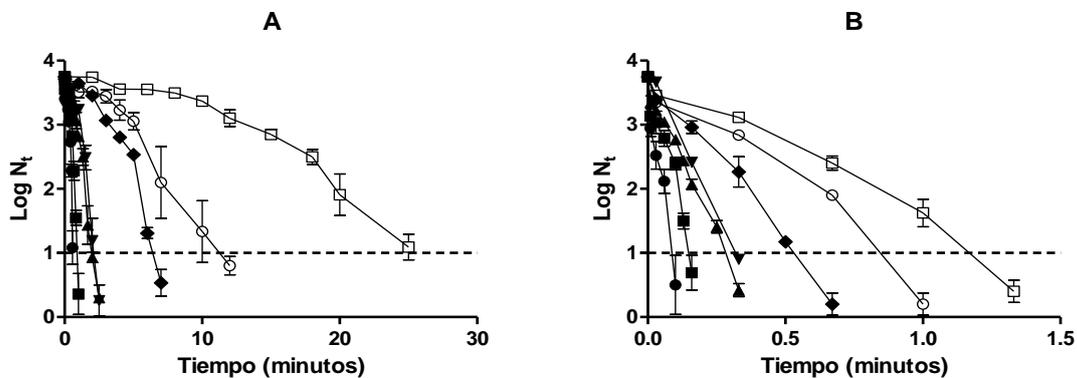


Figura 4.7.1. Gráficas de supervivencia de *B. subtilis* a 98 (□), 100 (○), 102 (◆), 104 (▼), 106 (▲), 108 (■) y 110°C (●). Medio de tratamiento: pH 7,0 (A) y 4,0 (B).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos incluidos en la tabla 4.7.1 permitieron concluir que los tiempos de reducción decimal eran menores en el medio de pH 4,0 y que la duración de los hombros era mayor en las curvas obtenidas a pH 7,0. Puesto que la duración de los hombros se achaca a fenómenos de daño y reparación celular, estos resultados parecían indicar que a pH 7,0 parte de la población era capaz de recuperarse de los daños que se iban produciendo en los primeros minutos de tratamiento, mientras que a pH 4,0 esta capacidad se veía reducida.

Tabla 4.7.1. Termorresistencia de *B. subtilis* a pH 7,0 y 4,0. Parámetros del ajuste del modelo de Geeraerd a los datos experimentales: S_L : longitud del hombro (min), k_{max} : velocidad específica de inactivación (1/min), D_t : tiempo para reducir un ciclo logarítmico (min). Se incluye el R^2 mínimo y el RMSE máximo de entre las 2-3 determinaciones experimentales.

pH	Tª (°C)	SL	K_{max}	D_t	R^2	RMSE
7,0	98	8,87±0,928	0,487±0,031	4,74±0,293	0,981	0,147
	100	3,31±0,996	0,833±0,120	2,80±0,413	0,967	0,188
	102	3,047±0,296	1,74±0,211	1,33±0,151	0,970	0,222
	104	0,717±0,454	5,070±0,788	0,461±0,067	0,993	0,410
	106	0,633±0,105	4,367±0,133	0,528±0,016	0,984	0,129
	108	0,493±0,055	13,53±1,97	0,172±0,023	0,990	0,110
	110	0,360±0,036	23,24±6,10	0,103±0,024	0,948	0,212
4,0	98	0,262±0,083	6,68±0,734	0,348±0,039	0,988	0,171
	100	0,223±0,025	9,573±0,677	0,241±0,017	0,980	0,281
	102	0,110±0,017	13,27±1,44	0,175±0,020	0,992	0,155
	104	0,033±0,011	22,5±1,22	0,102±0,006	0,998	0,066
	106	0,010±0,001	21,9±0,519	0,105±0,002	0,987	0,134
	108	0,000	51,5±18,4	0,050±0,022	0,953	0,276
	110	0,000	60,2±11,8	0,039±0,007	0,957	0,356

Para profundizar en los mecanismos involucrados en los fenómenos de daño térmico y recuperación de esta especie se procedió a recuperar en medio mínimo en anaerobiosis. La figura 4.7.2 muestra los resultados obtenidos tras aplicar tratamientos térmicos a distintas temperaturas en medio de pH 7,0. Los datos correspondientes a la recuperación en agar nutritivo (aerobiosis) se han incluido también en la figura a efectos comparativos. Como se puede observar, las características físico-químicas del medio mínimo en combinación con la anaerobiosis aumentaban la recuperación celular en todo el rango de temperaturas investigado -98 y 110°C-. La magnitud del efecto fue tal que tratamientos de duración suficiente para reducir los recuentos tres ciclos logarítmicos en el medio complejo apenas modificaban los obtenidos en el medio mínimo.

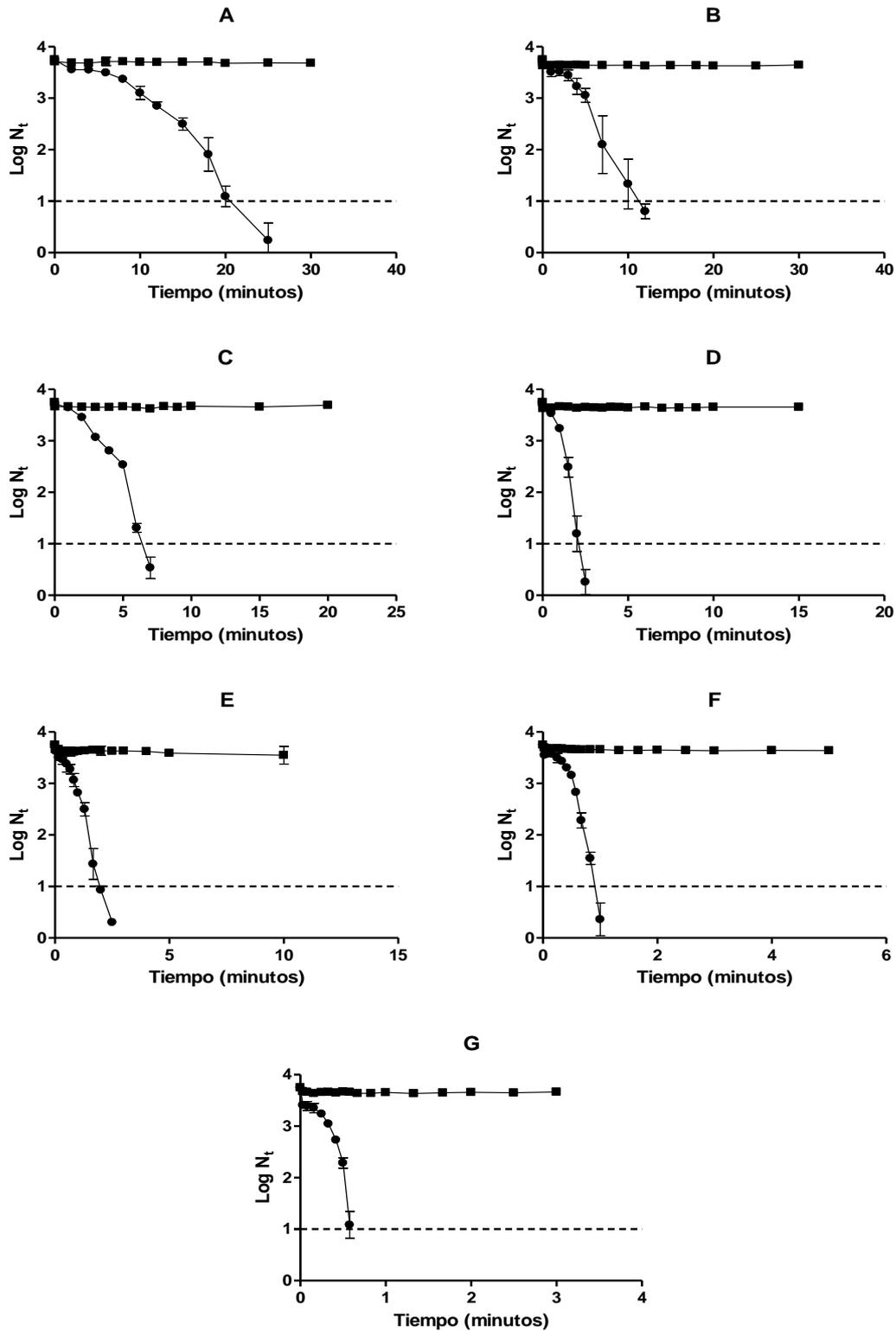


Figura 4.7.2. Gráficas de supervivencia de *B. subtilis* en tampón de pH 7,0 a 98°C (A), 100°C (B), 102°C (C), 104°C (D), 106°C (E), 108°C (F) y 110°C (G). Medio de recuperación: agar nutritivo (●) y MM-cys (■).

La figura 4.7.3 demuestra que la mayor capacidad de recuperación de las células en el medio mínimo también se manifiesta tras aplicar los tratamientos en medio de pH ácido. Este hecho resulta, al menos en cierta medida, sorprendente, dado que las gráficas de supervivencia obtenidas a igual

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

temperatura en medio ácido presentaban hombros de menor duración (Tabla 4.7.1) y valores D_t muy inferiores.

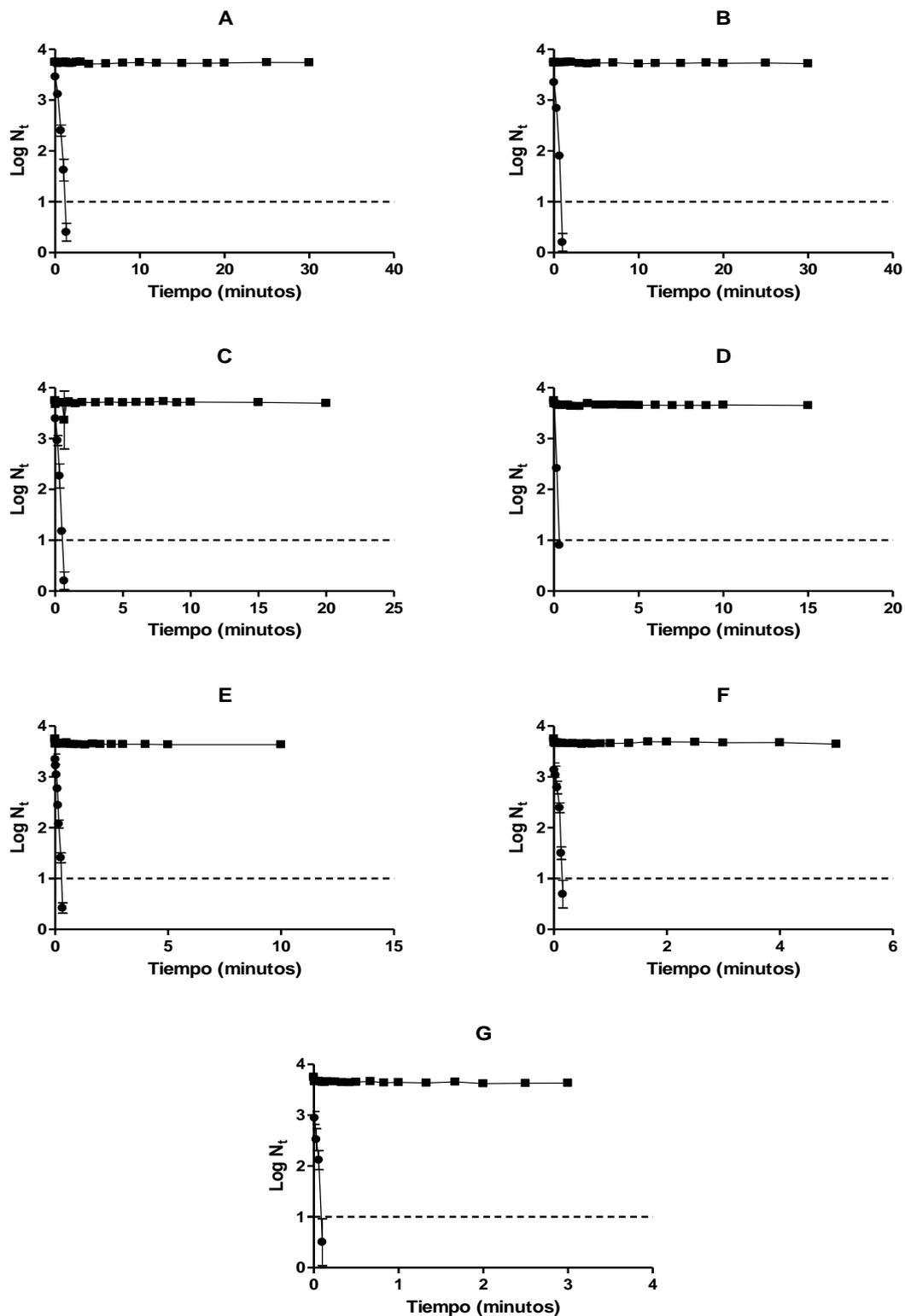


Figura 4.7.3. Gráficas de supervivencia de *B. subtilis* en tampón de pH 4,0 a 98°C (A), 100°C (B), 102°C (C), 104°C (D), 106°C (E), 108°C (F) y 110°C (G). Medio de recuperación: agar nutritivo (•) y MM-cys (▪).

Puesto que el efecto del medio mínimo era de gran magnitud, a ambos pHs, resultaba imposible deducir de los datos obtenidos sus parámetros de termorresistencia, por lo que se decidió aumentar la temperatura hasta valores inusuales para el estudio de esta especie: 125 y 130°C. La figura 4.7.4 muestra las gráficas de supervivencia obtenidas a ambas temperaturas. De las gráficas se puede deducir que los tiempos de reducción decimal de *B. subtilis* en estas condiciones de recuperación ($D_{130} > 1$ min) son cientos de veces superiores a los usualmente publicados para esta especie, y semejantes a los observados en especies esporuladas termófilas, como *G. stearothermophilus* (Feeherry y col., 1987; Abraham y col., 1990; Cebrián y col., 2017). Como se observa también en la figura este aumento de los valores D_t va acompañado de un aumento de la duración de los hombros.

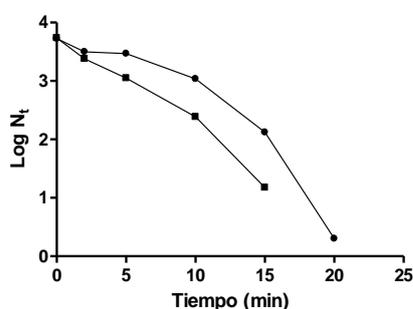


Figura 4.7.4. Gráficas de supervivencia de *B. subtilis* a 125 (■) y 130°C (●). Medio de recuperación MM-cys.

En definitiva, todos estos resultados permiten concluir que la siembra en el medio mínimo enriquecido con cisteína y su incubación en condiciones de anaerobiosis favorecía la recuperación celular hasta tal extremo que las células capaces de recuperarse podían llegar a representar hasta más del 99,99% de los esporos supervivientes. La magnitud de este efecto es mucho mayor que la observada en células vegetativas, lo que podría estar relacionado con las diferencias estructurales y metabólicas entre ambos grupos. Es conveniente recordar que los esporos latentes son ametabólicos y que, por tanto, es preciso que se inicie la germinación para que puedan repararse estos daños; dicho en otras palabras, en los esporos, a los daños infringidos a las estructuras comunes entre ambos grupos hay que añadir los ocasionados a moléculas y/o estructuras relacionadas con la germinación, tales como receptores de la germinación, enzimas hidrolíticas del *cortex*, etcétera.

Desde un punto de vista práctico, estos resultados indicarían que, aunque gran número de autores utilizan y han utilizado a lo largo de los años medios complejos para favorecer la recuperación y reparación celular tras la exposición de diferentes microorganismos a la acción de diversos agentes, en realidad la siembra en medios mínimos, como el MM-cys puede

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

resultar en determinadas circunstancias más adecuado. Seguramente estos medios serán más beneficiosos cuanto mayor sea la implicación de los daños oxidativos en la inactivación celular.

Dada la gran diferencia observada entre la recuperación en agar nutritivo y en medio mínimo y con el fin de determinar si la menor recuperación en el primero se debía a su complejidad, a una mayor velocidad de recuperación celular, a la presencia de peróxido de hidrógeno derivado del autoclavado del medio, a la menor actividad de diferentes enzimas detoxificantes, a la ausencia de alguna sal o incluso de cisteína, a las condiciones atmosféricas de recuperación o a otros posibles factores, se decidió llevar a cabo un estudio exploratorio con el fin de determinar qué factores y mecanismos influían en la mayor o menor protección tras el tratamiento. Para ello se diseñaron una serie de experimentos encaminados a intentar mejorar la reparación y/o germinación en agar nutritivo aerobiosis, o, alternativamente, a impedir la reparación en MM-cys anaerobiosis.

Con objeto de mejorar la recuperación en AN se estudió la influencia de la temperatura, y la adición de diferentes sustancias quelantes de ROS o con actividad redox.

Para estudiar el efecto de la **velocidad de recuperación** celular tras el tratamiento se partió de la hipótesis de que al disminuir la velocidad de recuperación, hecho que ocurre en MM-cys anaerobiosis, las células dispondrían de más tiempo para reparar los daños causados en sus estructuras tras el tratamiento térmico, o les permitiría ajustar las reacciones metabólicas implicadas en la recuperación. Como se puede observar en la figura 4.7.5, la disminución de la temperatura de recuperación, y por tanto la velocidad de las reacciones de reparación, no logró incrementar la supervivencia tras el tratamiento, sino exactamente lo contrario. Esto parece indicar que los efectos beneficiosos de recuperar las células en un medio mínimo no están relacionados con el enlentecimiento de las reacciones implicadas en la reparación celular.

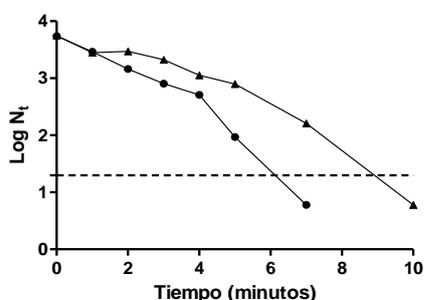


Figura 4.7.5. Gráficas de supervivencia de *B. subtilis* (100 °C) recuperado en agar nutritivo a 25°C (●) y 37°C (▲).

Seguidamente, dado que una de las razones por las que se cree que el medio mínimo podría ejercer un efecto protector en las células tratadas por diversos agentes es su bajo **potencial redox** -debido a la adición de cisteína-, y a la ausencia de ROS generados durante el autoclavado del medio, se estudió el efecto de diferentes sustancias quelantes y reductoras y de diferentes enzimas detoxificantes añadiéndolas al medio de recuperación (Figura 4.7.6). En este caso, como sustancias quelantes o reductoras se utilizaron: dipiridil (200 μM), como quelante de hierro intracelular, tiourea (150 mM), como quelante de radicales hidroxilo, y piruvato (1%), como neutralizante de peróxidos; y como enzimas detoxificantes: superóxido dismutasa (SOD) (225 U/ml), capaz de eliminar los radicales superóxido, y catalasa (25 U/ml), capaz de eliminar el peróxido de hidrógeno. Se añadió también almidón (1%) por ser una sustancia capaz de quelar de manera inespecífica sustancias potencialmente inhibitorias (Mackey, 2000).

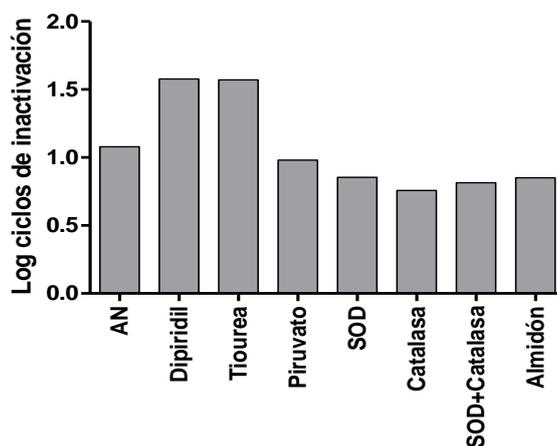


Figura 4.7.6. Supervivencia de *B. subtilis* tratado térmicamente (100 °C/ 7 min) y recuperado en AN y AN enriquecido con dipiridil (200 μM), tiourea (150 mM), piruvato (1%), superóxido dismutasa (SOD) (225 U/ml), catalasa (25 U/ml) o almidón (1%).

Como se puede observar en la figura 4.7.6 no existieron apenas diferencias entre añadir o no estos compuestos y enzimas al medio de recuperación. Únicamente la catalasa parecía ejercer un ligero efecto protector, mientras que el dipiridil y la tiourea dificultaban la reparación.

Por otro lado, y adoptando el enfoque contrario, se recuperaron también los esporos en MM-cys anaerobiosis, al que se añadieron diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno, con objeto de comprobar si el efecto protector de este medio se debía a la ausencia de trazas de ROS generadas durante el autoclavado. Como se puede observar en la figura 4.7.7, la adición de peróxido sí provocó un descenso ligero del número de esporos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

capaces de crecer tras el tratamiento, si bien no se observó una relación clara con la concentración añadida. Estos resultados indicarían que o bien el efecto protector del medio MM-cys anaerobiosis no está relacionado con su capacidad para reducir los daños oxidativos, o bien a que la capacidad para inhibir el efecto del peróxido de hidrógeno es muy superior a la concentración de H_2O_2 máxima añadida en el experimento. Serían necesarios más estudios para confirmar el efecto tanto de la adición de catalasa en AN, como de la de peróxido en medio mínimo, con objeto de poder atribuir cierto efecto oxidativo al proceso de recuperación y/o germinación tras el tratamiento, si es que existe.

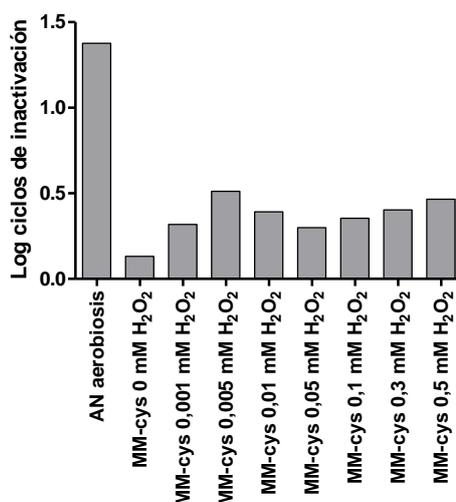


Figura 4.7.7. Tratamiento térmico de *B. subtilis* (99°C/8 min) y recuperación en agar nutritivo aerobiosis y medio mínimo con adición de concentraciones crecientes de H_2O_2 anaerobiosis.

Según se ha indicado previamente, además de los daños infringidos a las estructuras comunes en los esporos y las células vegetativas de las especies Gram-positivas, en los primeros podrían producirse daños adicionales en los sistemas de germinación. A efectos prácticos cualquiera de ambos tipos de daño podría explicar las diferencias de recuento observadas en ambos medios de recuperación. Por este motivo se decidió explorar posibles daños en los sistemas enzimáticos responsables de la hidrólisis del peptidoglicano del *cortex*. Para este propósito se compararon los recuentos obtenidos en agar nutritivo tras la siembra directa de supervivientes con los obtenidos en el mismo medio tras un pretratamiento con ácido dipicolínico.

La figura 4.7.8 muestra el efecto de un pretratamiento, antes de la siembra, con Ca-DPA en la recuperación de los esporos de *B. subtilis* tratados por el calor.

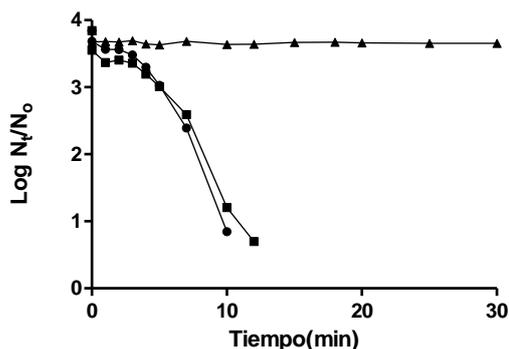


Figura 4.7.8. Gráficas de supervivencia de *B. subtilis* tratado a 100°C y recuperado en agar nutritivo (●), en agar nutritivo tras la exposición de las células a 20 mM de Ca-DPA durante 10 minutos (■) y medio mínimo MM-cys anaerobiosis (▲).

La germinación de los esporos es un proceso muy complejo, y en gran medida todavía desconocido, aunque se tiene la certeza de que existen varias rutas alternativas capaces de inducirla. Cualquiera que sea la ruta que inicie la germinación (la inducida por nutrientes, por calor, por altas presiones, etc.) actualmente se cree que un paso clave es la salida del DPA acumulado en el protoplasto del espora (Setlow, 2003). Este compuesto inicia la actividad lítica de los enzimas distribuidos entre el *cortex* y la membrana externa del espora, que comienzan a fragmentar el peptidoglicano. El colapso del *cortex* posibilita la entrada de agua en el protoplasto y, de esta forma, el comienzo de la actividad metabólica que conducirá a la vida vegetativa. En la actualidad no se conoce con certeza el mecanismo mediante el cual el DPA atraviesa la membrana interna al iniciarse la germinación, aunque se sospecha que puedan estar implicados los mismos sistemas de transporte que la célula madre utilizó para introducirlos en el preespora en la fase de esporulación (Paidhungat y col., 2001). Es sabido que si se produce una alteración de los sistemas de transporte del DPA no se iniciará la germinación, salvo que se añada el compuesto, dado que la capa más externa-el *coat*- es permeable a su paso. Estos datos indican que éste no es el caso puesto que el tratamiento con DPA posterior al calentamiento no llega ni a aproximarse al obtenido en el medio mínimo. Existe una posible explicación para estos resultados. Podría ocurrir que el calor alterase los enzimas líticos, por lo que incluso en presencia del DPA no se produciría la germinación. No obstante, no existen datos por el momento sobre la termorresistencia de estos enzimas por lo que más investigaciones serían necesarias para confirmar esta posible explicación.

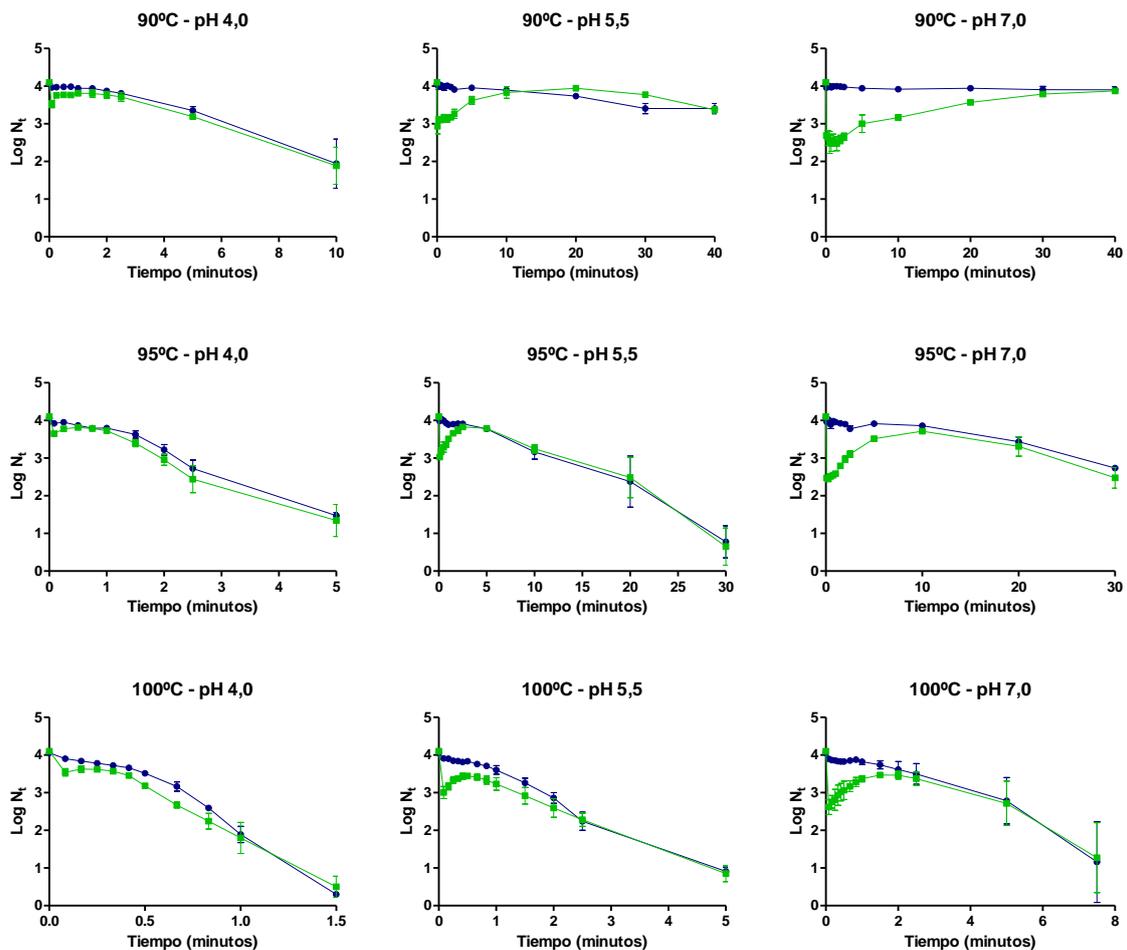
Otro comportamiento que merece aquí mención fue el obtenido tras realizar otra serie de experimentos con una nueva suspensión de la misma cepa de *B. subtilis*. En este caso se observó un cambio en el comportamiento del microorganismo durante la recuperación tras el

tratamiento térmico de modo que resultó imposible obtener recuentos en medio mínimo cisteína en condiciones de anaerobiosis. La nueva suspensión, preparada en principio en idénticas condiciones, no presentó nunca crecimiento en condiciones de medio mínimo-anaerobiosis, únicamente en aerobiosis y cuando el medio mínimo no contenía cisteína. Es destacable que sí se observaba crecimiento cuando se partía de células vegetativas y no de esporos (datos no mostrados), lo cual indica que se trataba de un efecto relacionado con la germinación de los esporos, y no de posibles defectos en el metabolismo basal en condiciones de escasez de nutrientes y anaerobiosis.

En este caso, el fenómeno observado queda bien ilustrado en las gráficas de supervivencia que se muestran en la figura 4.7.9. Como se observa en la figura, cuando los esporos de *B. subtilis* eran tratados térmicamente, a diferentes temperaturas y en medios de diferente pH, y posteriormente recuperados en agar nutritivo y medio mínimo MM-glucosa, en ambos casos en aerobiosis, se obtenían gráficas con perfiles muy diferentes. Las gráficas de supervivencia obtenidas en agar nutritivo presentaban, en la mayoría de los casos, un hombro que normalmente se atribuye a fenómenos de daño y recuperación. Las gráficas obtenidas en el medio mínimo presentaban una súbita caída al inicio de tratamiento, un posterior aumento del recuento y finalmente una caída aproximadamente exponencial. La caída inicial suele achacarse a la coexistencia de dos poblaciones, una de ellas de baja termorresistencia. Sin embargo, en este caso, dado que los esporos están vivos y son capaces de crecer en agar nutritivo, podría achacarse simplemente a una pérdida de la capacidad de germinar en el medio mínimo. Si la pérdida de la capacidad de germinación en los primeros instantes de tratamiento se debiese a la alteración de los receptores activados por nutrientes, el fenómeno se apreciaría en el medio complejo, pero no en el medio mínimo en el que tales germinantes no están, al menos los conocidos hasta el momento. Por otra parte, el aumento posterior del recuento se podría atribuir a un fenómeno de activación de esporos por acción del calor que compensa y en este caso incluso supera la velocidad de inactivación térmica, cuyo ritmo se deduce del tramo final de la curva. Lo sorprendente de estos resultados es que demuestran que estos diferentes comportamientos no son debidos a diferencias entre suspensiones sino que se deben a la coexistencia en un mismo espora de diferentes rutas de germinación dependientes del medio de cultivo. En resumen, estos resultados indican, o al menos permiten hipotetizar, que existe un mecanismo de germinación muy rápido y poco exigente que permite iniciar el proceso incluso en medios pobres a más del 90% de la población. Este mecanismo es muy termosensible y se pierde al inicio del tratamiento térmico en más del 99% de los esporos. Estos esporos, sin embargo siguen respondiendo a la presencia de nutrientes inductores de la

germinación como la L-alanina. Los esporos que han perdido el mecanismo de germinación poco exigente en nutrientes se comportan como los hasta ahora denominados superlatentes, de manera que son capaces de germinar en medios pobres si reciben una activación térmica. Este mecanismo de germinación poco exigente y muy termosensible no ha sido descrito hasta la fecha.

Además, como se puede observar en la figura 4.7.9, aunque este efecto se observó en todos los pH estudiados, fue más notorio conforme fue aproximándose a la neutralidad. Además, dentro de un mismo pH, la magnitud de la caída de recuento inicial en relación a la observada en agar nutritivo fue disminuyendo al aumentar la temperatura de tratamiento. Estas diferencias entre pHs y temperaturas posiblemente eran debidas a cambios en el balance existente entre la velocidad de alteración de los sistemas de germinación que se pierden al inicio del tratamiento y la velocidad de activación de rutas de germinación alternativas por efecto del calor.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

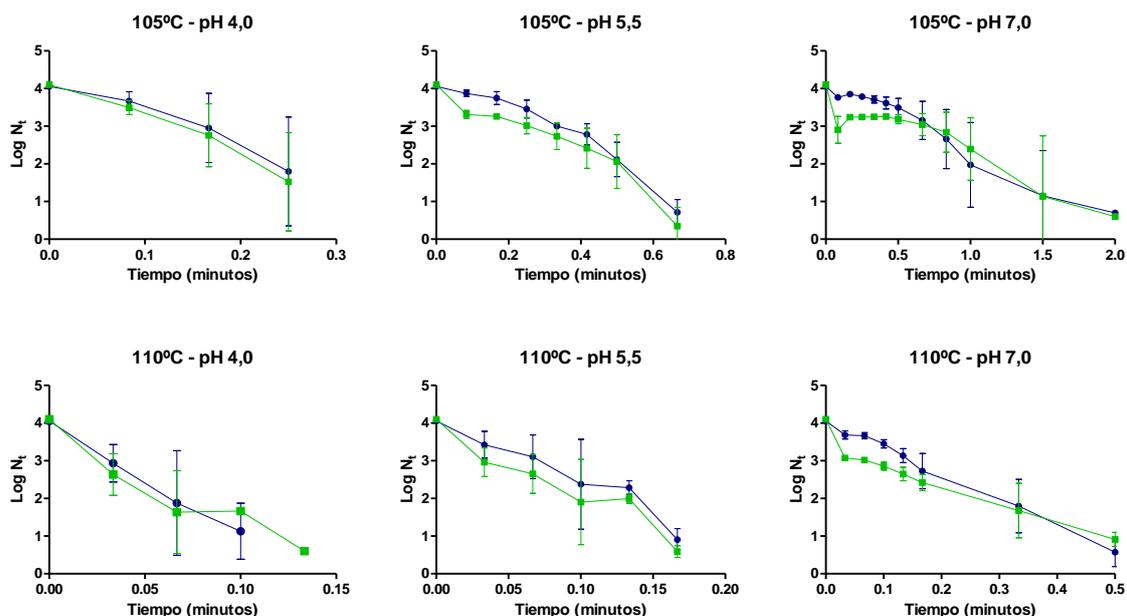


Figura 4.7.9. Termorresistencia de *B. subtilis* (90-110°C) a pH 4,0, 5,5 y 7,0 y recuperación en agar nutritivo (•) y medio mínimo (■) (aerobiosis).

Para comparar las cinéticas de activación y muerte por acción del calor a distintas temperaturas en los diferentes medios se hacía necesario utilizar modelos matemáticos adecuados. En las gráficas obtenidas en agar nutritivo el modelo era fácil de elegir. Puesto que en los hombros nunca se produjeron aumentos de recuento, se podía presumir que su presencia se debía únicamente a fenómenos de daño y recuperación celular. Por ello se eligió el modelo de Geeraerd para su descripción.

La elección de un modelo para describir las curvas obtenidas en el medio mínimo fue mucho más complicada. Ciertamente se han descrito muchos modelos basados en la coexistencia de esporos superlatentes, incapaces de germinar en un medio convencional, y latentes, capaces de germinar en un medio convencional, en una población de esporos. En general todos asumen que el calor transforma los esporos superlatentes en latentes, es decir, en esporos capaces de germinar en un medio convencional de recuperación a través de la activación, cuyo mecanismo no se conoce. La figura 4.7.10 esquematiza la hipótesis de partida para el desarrollo de estos modelos.

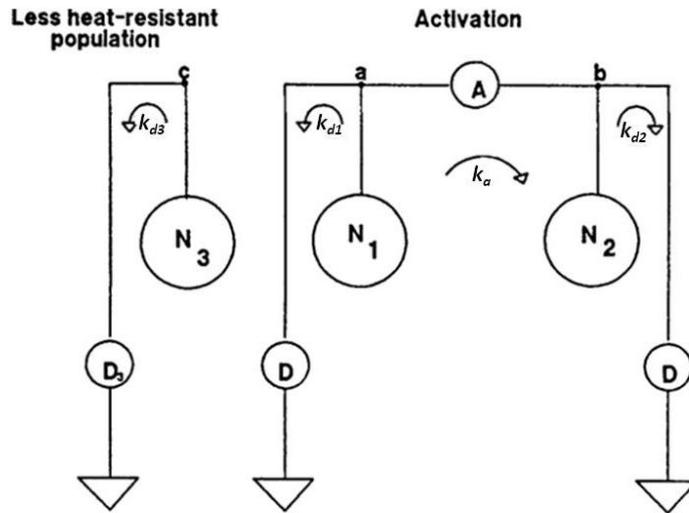


Figura 4.7.10. Diagrama de la población de esporos expuesta a una temperatura letal en el que se muestra el número de células (N) en varios estados y vías de reacción entre etapas que pueden ocurrir simultáneamente e independientemente. N_1 : población superlatente, N_2 : población latente + población superlatente activada y N_3 : población muy termosensible (Rodríguez y col., 1992).

A partir de esta idea básica se han desarrollado modelos muy variados, todos ellos con un objetivo exclusivamente práctico, ayudar a calcular los tiempos de tratamiento industriales teniendo en cuenta el retraso que suponía la fase de hombro. Sin embargo, en el momento de estudiar estos resultados se observó que los modelos existentes no eran adecuados para modelizar los hombros. De los parámetros de las fórmulas podía obtenerse un valor D_t de razonable fiabilidad, pero el que permitía describir el ritmo de activación no lo era. Por estos motivos se decidió intentar desarrollar un modelo adecuado para estos resultados.

El problema común a todos los modelos desarrollados es que, fuesen de la complejidad que fuesen, ninguno consideraba la existencia de fenómenos de daño y recuperación celular. Por ello el esquema general sobre el que debería basarse nuestro modelo es el que se esquematiza en la figura 4.7.11.

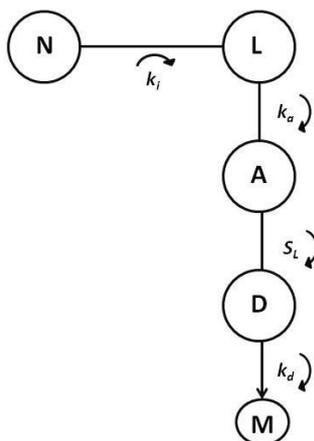


Figura 4.7.11. Diagrama de la población de esporos expuesta a una temperatura letal. N: número de esporos capaces de germinar, L: población con daños en los sistemas de germinación, A: población activada por el calor, D: población dañada por el tratamiento térmico, M: población inactivada por el tratamiento.

Para el desarrollo del modelo se asumió que todas las transformaciones seguían un orden exponencial, como es usual en todos los modelos desarrollados previamente. Además se consideró, ya que se deducía de los datos experimentales en medio mínimo, que la pérdida de la capacidad de germinación en medios mínimos era, a efectos prácticos, instantánea. A partir de estas premisas se desarrolló una ecuación que describía la transformación de los esporos que habían perdido el mecanismo de germinación rápido en capaces de germinar de nuevo en el medio mínimo. Estos esporos se dañarían, lo que daría lugar a una fase de retraso en el inicio de la muerte que se produciría finalmente siguiendo un curso exponencial. Ambos fenómenos podían ser descritos con la ecuación de Geeraerd, descrita en capítulos anteriores.

Para facilitar la interpretación de los valores de los parámetros del modelo se transformó la ecuación de Geeraerd original sustituyendo los logaritmos neperianos por los de base decimal. Esta es una transformación muy corriente en nuestros días en muchas ecuaciones clásicas, de hecho actualmente se utiliza así incluso para describir la cinética exponencial de muerte por el calor. La ecuación de Geeraerd transformada sería:

$$\text{Log}N = \text{Log}10 (N_0 * 10^{(-K_d * t)} * (10^{(K_d * S_L)}) / (1 + (10^{(K_d * S_L)} - 1) * 10^{(-K_d * t)}))$$

Donde:

- N_0 : Número de esporos capaces de germinar en el medio mínimo
- K_d : constante de inactivación (min^{-1})
- K_a : constante de activación (min^{-1})
- S_L : longitud del hombro (min)

El número de esporos capaces de germinar en medio mínimo serán el resultado de la suma de aquellos que ya poseían esa característica más aquellos que tras perderla la han recuperado por activación térmica; es decir:

$$N_0 = A_0 + L_0 - L_0 * 10^{(-Ka*t)}$$

Donde:

- A_0 : Número de esporos que no presentan daño en los sistemas de germinación a tiempo cero*.
- L_0 : Número de esporos que presentan daño en los sistemas de germinación a tiempo cero*.

*considerando tiempo cero como el primer tiempo (min) al que se extrajo muestra tras someter a las células a la temperatura estudiada.

Introduciendo esta ecuación en la ecuación general obtendremos otra que incluirá todos los comportamientos descritos.

$$\text{Log}N = \text{Log}10 \left((A_0 + L_0 - L_0 * 10^{(-Ka*t)}) * 10^{(-Kd*t)} * (10^{(Kd*SL)}) / (1 + (10^{(Kd*SL)} - 1) * 10^{(-Kd*t)}) \right) \quad \text{Ec. 4.1}$$

La figura 4.7.12 muestra tres ejemplos del ajuste de la ecuación desarrollada a los datos experimentales. Como se observa en la figura el ajuste es excelente. Los parámetros estadísticos que definen la bondad de los ajuste se han incluido en las tablas correspondientes.

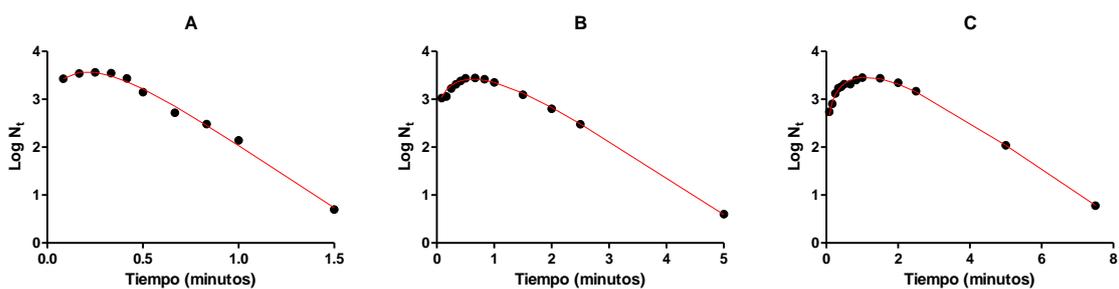


Figura 4.7.12. Ejemplos de ajuste del modelo a los valores reales obtenidos tras el tratamiento térmico de *B. subtilis* (100°C) a pH 4,0 (A), 5,5 (B) y 7,0 (C); recuperación en medio mínimo.

La tabla 4.7.2 muestra los valores obtenidos para el ajuste de las gráficas de supervivencia obtenidas en AN a la ecuación de Geeraerd, mientras que la tabla 4.7.3 muestra los valores obtenidos para cada parámetro descrito por el modelo desarrollado (Ecuación 4.1) y los parámetros de bondad del ajuste para cada pH y temperatura estudiada cuando *B. subtilis* fue

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

recuperado en medio mínimo. Las tablas incluyen también el valor D_t calculado a partir de la constante de inactivación ($D_t=1/K_d$). Los valores Af y Bf (accuracy y bias factor) de bondad del ajuste estaban comprendidos entre 0,994 y 1,006.

Tabla 4.7.2. Termorresistencia de *B. subtilis* a pH 4,0, 5,5 y 7,0, recuperando en agar nutritivo; parámetros del ajuste del modelo de Geeraerd a los datos experimentales: K_{max} : velocidad de inactivación (min^{-1}), D_t : tiempo de reducción decimal (min), S_L : longitud del hombro (min).

pH	Tª	K_{max}	D_t	S_L	R ²	RMSE
4,0	90	0,694±0,257	3,678±1,495	2,98±0,857	0,995	0,041
	95	1,423±0,035	1,619±0,039	0,788±0,352	0,984	0,117
	100	8,093±0,953	0,287±0,035	0,447±0,042	0,990	0,088
	105	37,7±2,94	0,061±0,005	0,041±0,030	0,993	0,145
	110	77,2±30,4	0,032±0,013	0,016±0,008	0,962	0,380
5,5	95	0,296±0,013	7,78±0,335	5,94±3,17	0,983	0,110
	100	2,300±0,646	1,055±0,290	0,840±0,266	0,990	0,064
	105	16,3±0,690	0,142±0,006	0,229±0,027	0,983	0,167
	110	73,9±5,23	0,031±0,002	0,081±0,002	0,970	0,253
7,0	95	0,193±0,031	12,1±1,92	15,6±2,68	0,958	0,080
	100	0,996±0,358	2,32±1,04	2,59±1,17	0,990	0,078
	105	6,16±1,67	0,388±0,105	0,412±0,206	0,984	0,157
	110	18,7±4,25	0,128±0,032	0,041±0,057	0,977	0,190

Tanto la ecuación de Geeraerd, en el caso de las gráficas obtenidas en agar nutritivo, como la ecuación 4.1, en las obtenidas en el medio mínimo, proporcionaron un buen ajuste a los datos experimentales, como se desprende de los coeficientes de determinación y del error cuadrático medio. Los excelentes ajustes obtenidos confieren fiabilidad a los parámetros de las ecuaciones lo que permitió hacer comparaciones entre los ritmos de cada una de las transformaciones experimentadas por los esporos.

Por lo que respecta a los datos obtenidos en AN, como se desprende de los parámetros obtenidos con el modelo (Tabla 4.7.2) y como se puede observar en la figura 4.7.13, cabe destacar que conforme aumentó la temperatura de tratamiento también lo hizo, siguiendo un

orden exponencial la constante de inactivación (A). Por el contrario la longitud del hombro (B), disminuyó, también exponencialmente. Por otro lado, al comparar los valores obtenidos en los medios de diferentes pHs, para una misma temperatura, se observó que los valores de la constante de inactivación a pH ácido (pH 4,0) siempre fueron mayores que a pH 5,5 y éstos que a pH neutro (pH7,0). En el caso de la longitud del hombro se observó que a pH ácido su duración era menor que a pH neutro. Ambos valores indicaban una inactivación más rápida en pH ácido que en neutro, aspecto ampliamente documentado. Quizás el aspecto de mayor interés de estos resultados sería que la presencia de hombros y su duración sugieren que la menor termorresistencia en medios ácidos está relacionada con una menor capacidad de reparación de daños subletales en el esporo.

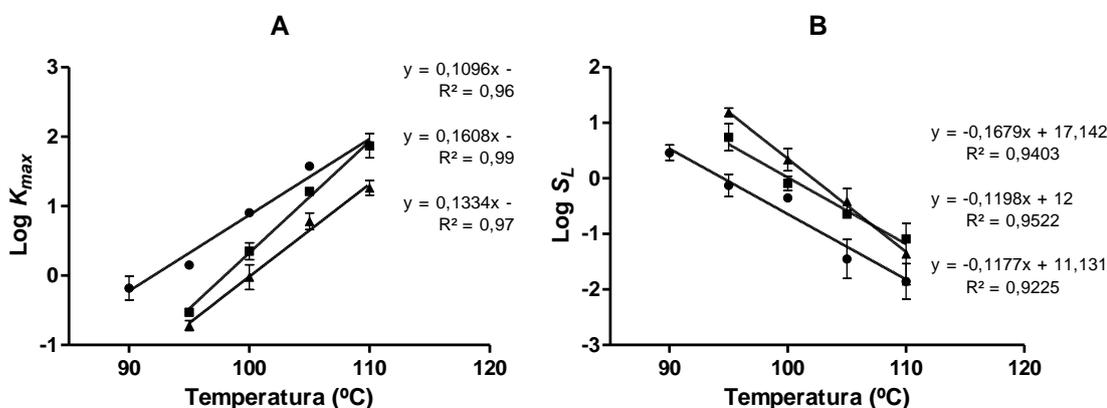


Figura 4.7.13. Gráficas de termodependencia de la constante de inactivación (A) y de la longitud del hombro (B) obtenidas tras el tratamiento térmico de *B. subtilis* a pH 4,0 (●), 5,5 (■) y 7,0 (▲) y su posterior recuperación en agar nutritivo.

Por otro lado, tras modelizar los valores obtenidos durante el tratamiento térmico de *B. subtilis* recuperando en medio mínimo (Tabla 4.7.3 y Figura 4.7.14), con la ecuación 4.1, se observó, al igual que al recuperar en AN, un aumento de la constante de inactivación y una disminución de la longitud del hombro. Además, se observó un aumento de la constante de activación de los esporos conforme aumentaba la temperatura, hasta alcanzar un máximo. Según nuestra hipótesis, los esporos con los sistemas de germinación rápida dañados se activarían por la acción del calor, y que esta activación posterior sería tanto más rápida cuanto mayor fuese la temperatura de tratamiento. Además, estos resultados indican también que la activación a pH neutro es más rápida que la inactivación por lo que a las temperaturas más altas la caída inicial por pérdida de capacidad de germinación quedaría enmascarada. Por otro lado, el número de células incapaces de germinar (L_0), estimado por el modelo era muy elevado en los tratamientos a pH 7,0, particularmente a las temperaturas más bajas,

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

condiciones para las cuales prácticamente era equivalente a la totalidad de la población. Un análisis detallado del valor L_0 parece indicar que la existencia de pequeñas diferencias en este parámetro es consecuencia del tratamiento matemático. Dicho de otro modo, a pHs más ácidos y/o temperaturas más elevadas, la rápida inactivación enmascara el fenómeno de activación impidiendo una buena estimación del parámetro L_0 . En nuestra opinión, la totalidad de la población de esporos sería incapaz de germinar en medio mínimo al ser expuesta a la acción de calor, y la activación comenzaría de manera simultánea y muy rápida durante los primeros instantes.

Tabla 4.7.3. Termorresistencia de *B. subtilis* a pH 4,0, 5,5 y 7,0, recuperando en medio mínimo; parámetros del ajuste del modelo desarrollado a los datos experimentales: K_a : constante de activación (min^{-1}), K_d : constante de inactivación (min^{-1}), S_L : longitud del hombro (min), D_t : tiempo de reducción decimal (min). A_0 : ufc capaces de germinar, L_0 : ufc incapaces de germinar, -: no determinado.

pH	T ^a	K_a	K_d	D_t	S_L	A_0	L_0	R ²	RMSE
4,0	90	0,262±0,006	0,273±0,079	3,418±0,363	1,72±0,884	3,52±0,091	3,96±0,033	0,987	0,076
	95	0,921±0,049	0,589±0,103	1,133±0,115	0,740±0,085	3,64±0,036	3,92±0,019	0,969	0,083
	100	1,44±0,183	3,31±0,944	0,321±0,058	0,296±0,107	3,54±0,098	3,96±0,034	0,990	0,079
	105	-	15,3±5,27	0,0697±0,024	0,121±0,039	3,49±0,183	3,97±0,062	0,970	0,045
	110	-	34,5	0,029	0,0647	3,01	4,07	0,998	0,033
5,5	90	0,0221±0,007	0,0840±0,004	11,93±0,688	33,3±1,80	2,94±0,206	4,071±0,018	0,907	0,101
	95	0,0109±0,023	0,143±0,012	7,019±0,599	6,85±1,89	3,029±0,043	4,066±0,004	0,955	0,153
	100	0,290±0,066	0,626±0,148	1,313±0,044	0,544±0,074	3,006±0,160	4,066±0,014	0,989	0,073
	105	-	8,28±3,25	0,131±0,051	0,316±0,172	3,31±0,107	4,026±0,021	0,980	0,118
	110	-	36,3±10,01	0,029±0,008	0,0986±0,16	3,18±0,032	4,049±0,004	0,975	0,156
7,0	95	0,0115±0,002	0,120±0,019	8,461±1,429	19,5±2,64	2,47±0,028	4,094±0,001	0,926	0,156
	100	0,0669±0,028	0,455±0,144	2,361±0,949	2,86±1,15	2,62±0,193	4,089±0,006	0,943	0,152
	105	0,0207±0,019	3,065±0,687	0,35±0,075	0,636±0,225	3,15±0,004	4,052±0,001	0,966	0,141
	110	-	8,97±6,20	0,192±0,185	0,139±0,045	3,073±0,022	4,062±0,002	0,986	0,092

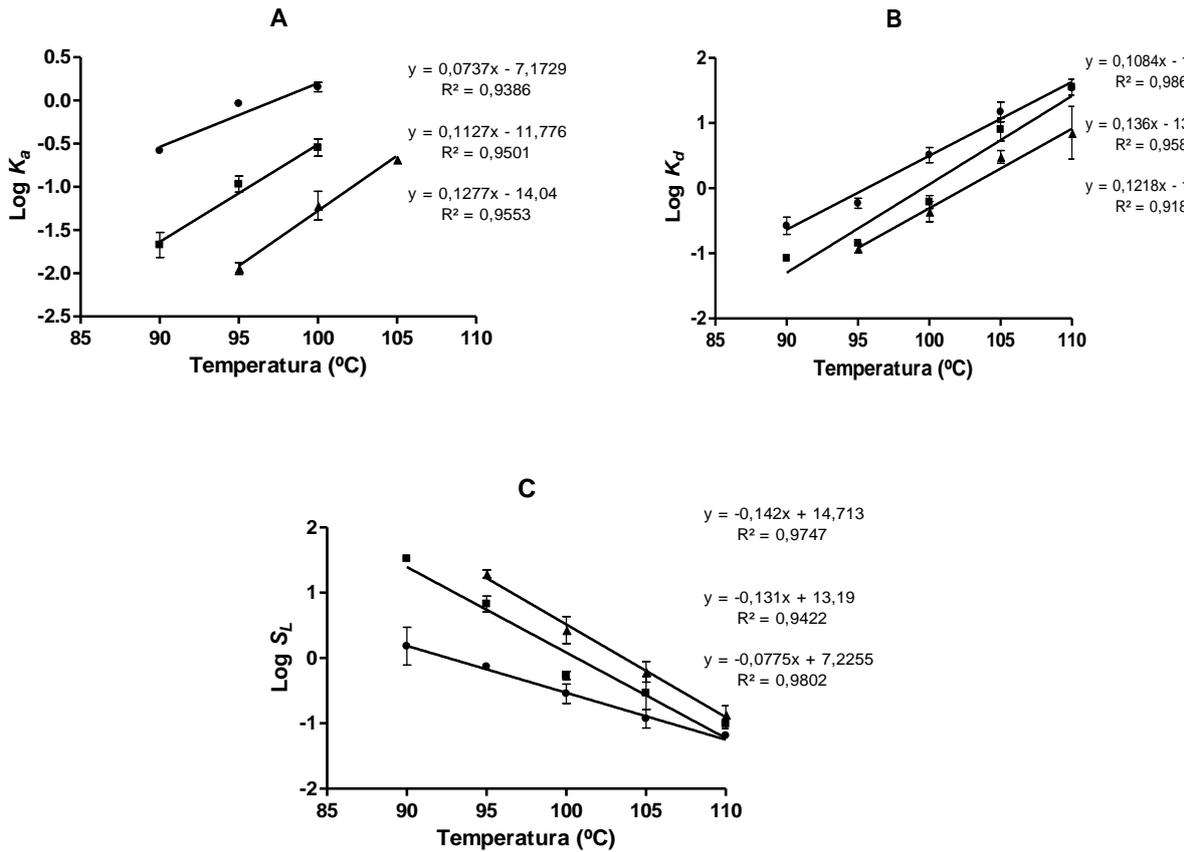


Figura 4.7.14. Gráficas de termodependencia de la constante de activación (A), constante de inactivación (B), y de la longitud del hombro (C) obtenidas tras el tratamiento térmico de *B. subtilis* a pH 4,0 (●), 5,5 (■) y 7,0 (▲) y su recuperación en medio mínimo.

A partir de los valores D_t , obtenidos para cada condición de recuperación y pH, se obtuvo el valor z (Tabla 4.7.4), el cual indica la termodependencia de las reacciones que conducen a la inactivación celular.

Tabla 4.7.4. Valor z para cada pH y condición de recuperación.

pH	Agar nutritivo	Medio mínimo
4,0	8,37	9,22
5,5	6,01	7,35
7,0	6,83	8,21

El análisis de los resultados demostró que no existían diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre los valores z obtenidos a los tres pHs en el medio de recuperación

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

mínimo. Además, al comparar los valores z obtenidos en ambos medios de recuperación no se observaron diferencias significativas para ninguno de los pHs ($p > 0.05$).

En resumen, los resultados mostrados han puesto de manifiesto que durante el tratamiento térmico de los esporos se producen diversos procesos fisiológicos que alteran una ruta de germinación muy termosensible lo que impide su crecimiento en medio mínimo. Al proseguir el tratamiento térmico los esporos se activan por el calor, aunque más lentamente, lo que les permite germinar de nuevo en el medio mínimo. La cinética de germinación resultante de estos procesos puede describirse matemáticamente, considerando que además de la muerte y activación se producen fenómenos de daño y reparación. Estos datos no permiten en principio discernir cuáles son los mecanismos involucrados en estas rutas de germinación, aunque previsiblemente no están relacionados con la más conocida, inducción de la germinación por nutrientes, puesto que el fenómeno no se observa en agar nutritivo.

Sin embargo, con el fin de confirmar que la ausencia de nutrientes en el medio mínimo no era la causa de la inhibición de la germinación durante los primeros instantes de tratamiento se decidió añadir al medio mínimo diferentes aminoácidos inductores de la germinación mediada por nutrientes. De esta manera, si la adición elevaba el recuento en medio mínimo significaría que los sistemas de germinación por nutrientes, serían los responsables de la mayor recuperación en AN. Este hecho confirmaría que la ausencia de germinación en medio mínimo sería debida a daños en otros sistemas de germinación. Además, se estudió también el efecto de la exposición a Ca-DPA (5 mM) de las células tratadas térmicamente, con el fin de determinar si podrían ser los sistemas de germinación por Ca-DPA los que se estaban dañando durante los primeros momentos del tratamiento. Para este experimento se escogieron condiciones de tratamiento que permitían observar claramente la diferencia de recuento entre el medio complejo y el mínimo (90°C/2 min). La figura 4.7.15 ilustra los resultados obtenidos.

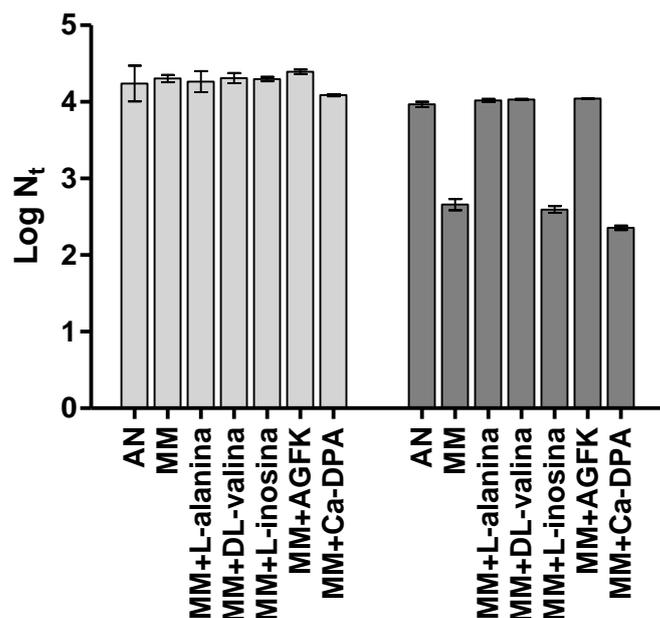


Figura 4.7.15. Recuperación de *B. subtilis* antes (barra gris claro) y después (barra gris oscuro) del tratamiento térmico (90 °C/ 2 min).

Como muestra la figura 4.7.15 la adición de diferentes compuestos germinantes al medio mínimo, tales como la L-alanina, la DL-valina y el complejo AGFK, permitieron que la recuperación en ambos medios estuviese al mismo nivel, a diferencia de lo que ocurrió cuando *B. subtilis* se recuperó en medio mínimo o en este medio con adición de L-inosina. Estos resultados confirmaron la hipótesis previamente planteada, ya que la adición de determinados nutrientes germinantes permitía la recuperación celular en medio mínimo. Si bien es cierto que tras la adición de L-inosina no se observó recuperación, ello posiblemente sea debido a la ausencia de receptores para este aminoácido en el microorganismo estudiado.

Es generalmente aceptado que los esporos pueden germinar en presencia de nutrientes como aminoácidos individuales, azúcares o purinas. A modo de ejemplo, se ha descrito que *B. subtilis* germina en presencia de L-alanina, L-valina o una mezcla de nutrientes (L-asparagina, glucosa, fructosa e iones potasio (AGFK)) (Moir, 2006; Paredes-Sabja y col., 2011). Tras estar en contacto con los nutrientes un determinado tiempo, del orden de segundos, los esporos son capaces de germinar y la germinación continúa aun cuando los nutrientes se eliminan. Estos nutrientes son detectados por diferentes receptores (GRs). Los más estudiados y descritos son GerA, GerB y GerK. Todos ellos contienen tres subunidades, A, B y C, y la falta o el daño de una de estas subunidades significa, generalmente, la pérdida de las funciones de estos receptores (Moriyama y col., 1999; Setlow y col., 2017). En *B. subtilis* estos receptores son codificados por los operones *gerA*, *gerB* y *gerK*, respectivamente. El receptor GerA reconoce la L-alanina y la L-

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

valina, mientras que los receptores GerB y GerK responden de manera conjunta cuando la mezcla AGFK se añade al medio (Atluri y col., 2006; Paredes-Sabja y col., 2011). Además, *B. subtilis* también tiene otros homólogos al operón *gerA* (*gerF*, *gerC* y *gerD*) cuya función todavía es desconocida (Paidhungat y Setlow, 2000). Por otro lado, Hornstra y col. (2006) describieron una eficiente germinación de *B. cereus* en presencia de inosina gracias a los receptores GerG y GerI, sin embargo, no se ha descrito hasta la fecha qué posible receptor se encarga de detectar este compuesto en *B. subtilis*, por lo que no se sabe con claridad si este microorganismo es capaz de germinar en presencia de este compuesto o no. Nuestros resultados indican que no sería el caso en nuestro microorganismo, si bien no podemos descartar que se estuviesen dañando por efecto del calor.

Por otro lado, la exposición de los esporos tras el tratamiento térmico (90°C/2 min) a Ca-DPA no favoreció su posterior germinación en medio mínimo, observándose un crecimiento similar al observado al recuperar las células tratadas en medio mínimo. Por lo tanto, estos resultados parecían indicar que el tratamiento térmico podría estar dañando los sistemas de germinación por Ca-DPA. Es importante recordar que las condiciones utilizadas, 90°C/2 min, corresponden a un tratamiento que todavía no ha provocado apenas la activación de los esporos que habían perdido la capacidad de germinar en el medio mínimo.

Es importante tener en mente que los esporos de *B. subtilis* nativos, no tratados por el calor, eran capaces de crecer, y con ello germinar en medio mínimo-glucosa, que carece de nutrientes a priori identificados como inductores de la germinación. Una posibilidad para explicar este comportamiento sería que estuviesen involucrados los receptores GerB+GerK, que responden conjuntamente a la mezcla AGFK, pero que fuesen capaces de reaccionar frente a la mezcla parcial glucosa-potasio.

Por ello, con el fin de aportar nuevos conocimientos sobre el daño térmico a los sistemas de germinación se diseñó el siguiente experimento. Los esporos nativos y tratados por calor (70°C/15 min) fueron suspendidos en agua destilada y en agua con diferentes compuestos germinantes (L-alanina, DL-valina, L-inosina, AGFK, GK y Ca-DPA) y a lo largo del tiempo, hasta 2 horas, se extrajeron muestras que se sembraron en agar nutritivo. Además, la mitad de las muestras fueron pasterizadas (80°C/10 min), con el fin de inactivar los esporos germinados tras la exposición a los diferentes compuestos. También se sembraron, como referencia, en agar nutritivo. Con este experimento se quiso determinar si los sistemas de germinación eran dañados tras un tratamiento térmico de 70°C/15 minutos, en cuyo caso las células no germinarían al ponerse en contacto con estos compuestos y, por lo tanto, el recuento

mostrado a lo largo del tiempo no variaría. Sin embargo, si los sistemas de germinación permaneciesen activos, el recuento a lo largo del tiempo disminuiría por efecto del tratamiento de pasterización sobre las células vegetativas recién formadas. El tratamiento elegido fue de 70°C/15 minutos, ya que se comprobó previamente que estas condiciones reproducían la caída inicial del recuento observado en las gráficas de supervivencia de la figura 4.7.9. La respuesta de los esporos al tratamiento térmico a temperaturas entre 50 y 90°C (a pH 7,0) se incluye en la figura 4.7.16.

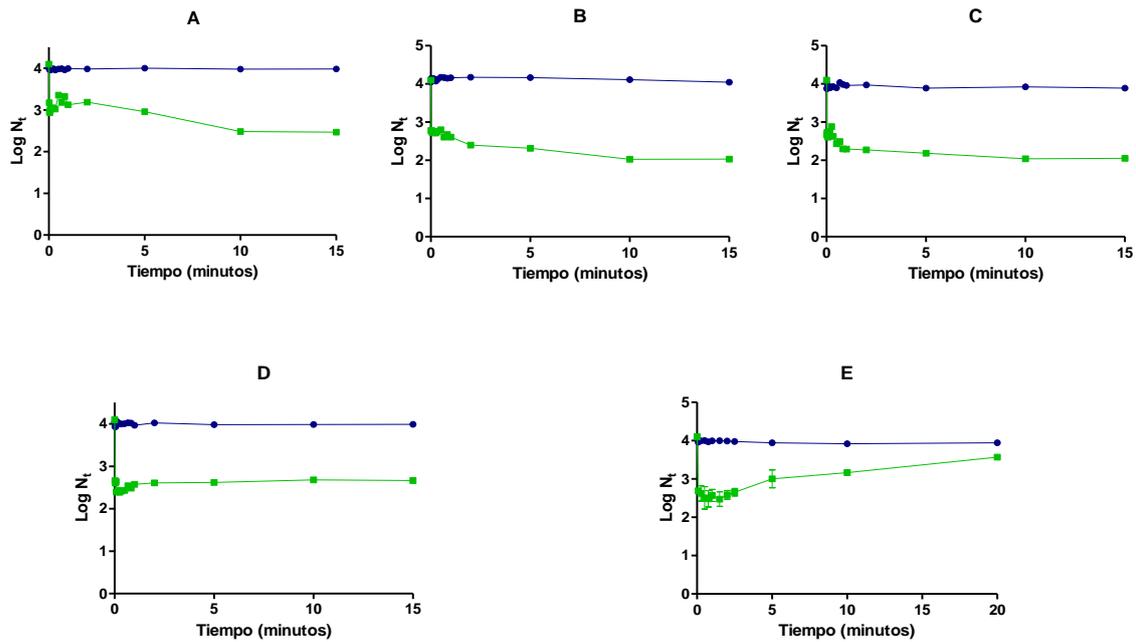
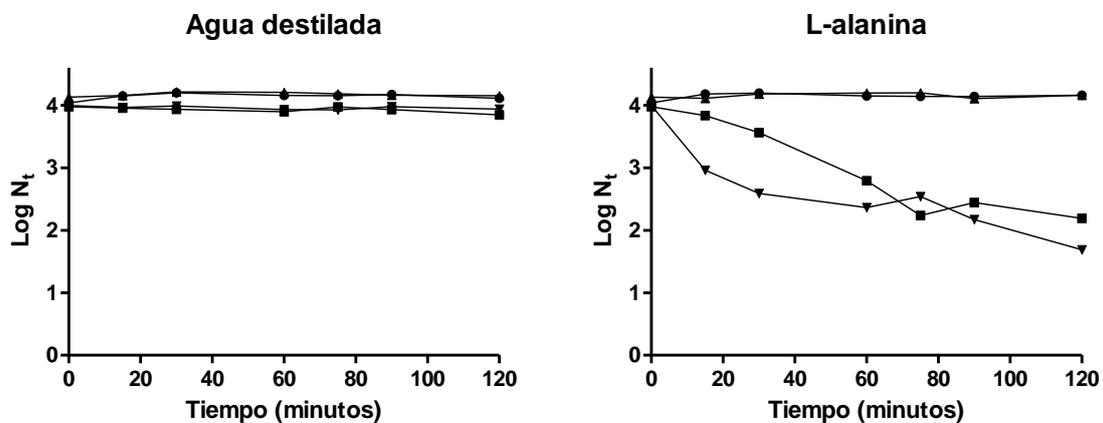


Figura 4.7.16. Gráficas de supervivencia de esporos *B. subtilis* (pH 7,0) a 50 (A), 60 (B), 70 (C), 80 (D) y 90°C (E) y recuperación en agar nutritivo (●) y medio mínimo (■) aerobiosis.

La figura 4.7.17 muestra los resultados obtenidos tras la realización de este experimento.



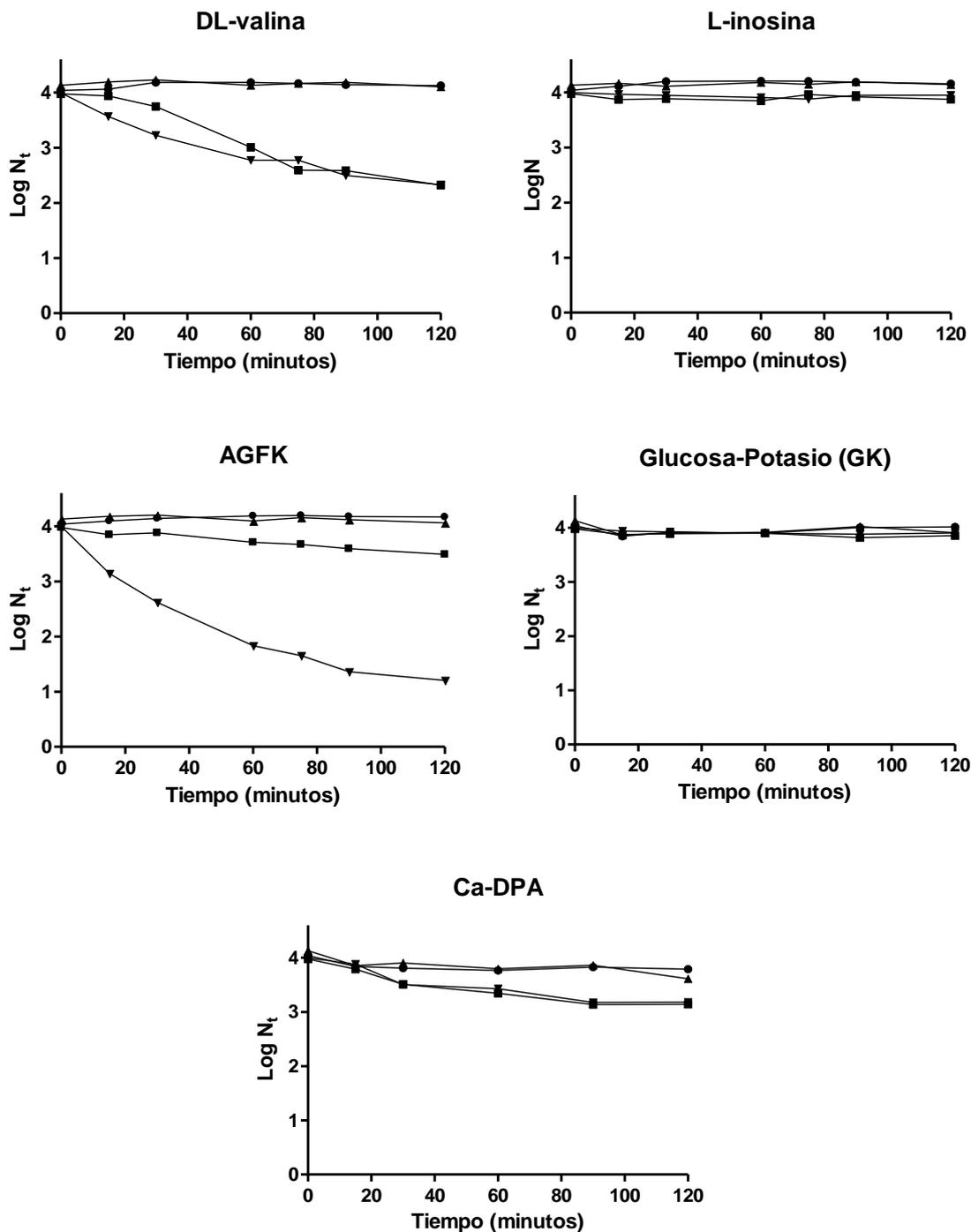


Figura 4.7.17. Estudio del daño en los sistemas de germinación de *B. subtilis* debido al tratamiento térmico. Esporos nativos (●), esporos tratados (70°C/15 min) (▲), esporos nativos pasteurizados (80°C/10 min) (■) y esporos tratados (70°C/15 min) pasteurizados (80°C/10 min) (▼).

Estos resultados coincidían con los obtenidos previamente (Figura 4.7.15), ya que tanto las células nativas como las tratadas térmicamente germinaron en presencia de L-alanina y DL-valina. Por lo tanto, podemos concluir que los receptores de la germinación de L-alanina y DL-valina no sufrieron daño durante el tratamiento de 70°C/15 min. Por otro lado, los resultados obtenidos con L-inosina demuestran que efectivamente, esta cepa de *B. subtilis* no respondía a

la inducción de la germinación por este aminoácido en ninguna condición experimental. Además, cuando estos esporos fueron expuestos al complejo AGFK (L-asparagina, glucosa, fructosa e iones potasio) se observó que las células nativas germinaron en cierto grado, mientras que las células tratadas previamente a 70°C mostraron una germinación mucho mayor. Por ello, estos resultados parecían indicar que el tratamiento térmico a 70°C efectivamente activaba los receptores dependientes de AGFK. No obstante, cuando estudiamos la respuesta de estos receptores a una mezcla parcial, glucosa+potasio, que sí está presente en el medio mínimo, (Figura 4.7.17, Glucosa-Potasio) no se observó germinación en ningún caso, ya fuesen los esporos nativos o tratados térmicamente a 70°C. Este resultado implica que estos receptores no estarían implicados en el fenómeno de pérdida de germinación y activación posterior en la recuperación en medio mínimo observado en nuestras gráficas.

Por último, se observó que la exposición a Ca-DPA de los esporos nativos y tratados a 70°C permitía cierta germinación, similar en ambos casos, lo que parecía indicar que este compuesto favorecía la germinación de *B. subtilis*, pero que no se producía una activación por efecto del calor. En este caso, la germinación era menor que la observada tras la exposición a determinados nutrientes (L-alanina, DL-valina o AGFK) lo que podría ser debido a que estos nutrientes indujesen una germinación más rápida y/o efectiva. Sin embargo, estos resultados parecen no concordar con lo observado en la figura 4.7.15 donde se ha visto que la exposición al DPA no inducía la posterior germinación en medio mínimo de los esporos tratados por calor. Quizás ello se deba a las condiciones de temperatura y tiempo necesarias para activar este sistema de germinación, y serían necesarios estudios bajo otras condiciones experimentales para poder determinar si la germinación por Ca-DPA está involucrada o no en el efecto observado.

En resumen, de los resultados expuestos anteriormente se puede desprender que los sistemas de germinación por nutrientes más frecuentes de *B. subtilis* (los dependientes de L-alanina, L-valina y el complejo AGFK) no son los responsables del efecto observado en medio mínimo, y serían otros sistemas de germinación los que sufrirían un daño rápido tras la exposición al calor, dando lugar a un descenso instantáneo en el número de supervivientes, que se recuperaría progresivamente debido a su activación por calor. De manera recíproca, la mayor recuperación observada en medio AN en comparación al medio mínimo, se debería a la actuación de los receptores de germinación por nutrientes. Por lo tanto, cuando los esporos son recuperados en un medio complejo, AN, los posibles daños y ulterior activación de los

sistemas de germinación alternativos a los receptores de nutrientes no dan lugar a cambios en los recuentos de supervivientes.

Los mecanismos que provocan la activación por calor de la germinación de los esporos no están bien caracterizados, y en la mayoría de los casos se han estudiado únicamente aquellos en los que intervienen receptores de nutrientes. Por ejemplo, se ha propuesto que la activación podría explicarse por un cambio conformacional causado por el calor en una proteína receptora de nutrientes, que la hiciera más afín (Luu y col., 2015). Se necesitan más investigaciones para describir qué sistemas de germinación son dañados durante estos tratamientos térmicos y qué mecanismos están implicados en su activación posterior. En la literatura científica se describen sistemas de germinación independientes de los receptores de nutrientes (Setlow, 2014), como por ejemplo las altas presiones hidrostáticas, la exposición al Ca-DPA o a fragmentos de peptidoglicano. En nuestro caso, podemos hipotetizar que el tratamiento térmico podría causar la liberación de cierta cantidad de Ca-DPA, o de fragmentos de peptidoglicano, de manera que en los primeros minutos de tratamiento se fuera activando la germinación en los esporos adyacentes. Aunque sería necesario comprobarlo experimentalmente, la liberación de Ca-DPA durante el tratamiento térmico ha sido demostrada experimentalmente por otros autores (Alimova y col., 2006). Como se ha demostrado anteriormente, la exposición de los esporos a Ca-DPA externo parece favorecer la germinación, sin embargo este efecto podría depender de las condiciones de aplicación del tratamiento térmico.

Finalmente, de todos los resultados mostrados en este capítulo se desprende una importante observación, y es que existen aspectos no controlados de la obtención y/o almacenamiento de las suspensiones de esporos bacterianos que influyen en su comportamiento posterior. En nuestro caso, tras trabajar con dos suspensiones de *B. subtilis* obtenidas, en principio, en las mismas condiciones, se han observado dos comportamientos muy diferentes en lo que se refiere a la recuperación tras el calentamiento.

Ambas suspensiones mostraron una resistencia intrínseca al calor, entendida como aquella que se estima tras la recuperación en condiciones estándar (Agar nutritivo, aerobiosis), comparable ($D_{100}=2,8$ min para la primera suspensión y $D_{100}=2,6$ min para la segunda suspensión). Sin embargo, en una de las suspensiones los esporos no fueron capaces de desarrollarse en medio mínimo-cisteína-anaerobiosis, mientras que en la otra sí lo hacían, y además mostrando una termorresistencia muy elevada, a nivel de algunas de las especies esporuladas termófilas más termorresistentes. Los resultados obtenidos hasta el momento no

nos permiten afirmar si este incremento tan notable en la recuperación celular está relacionado o no con un mejor mantenimiento de la homeostasis redox en el esporo germinante. Sí que es importante tener en cuenta que, en la segunda suspensión estudiada, en la que el medio mínimo no permitía el crecimiento de los esporos en condiciones de anaerobiosis, este efecto parecía deberse a una dificultad en la germinación en este medio, ya que las células vegetativas de este microorganismo sí que crecieron posteriormente en esas condiciones de restricción de nutrientes bajo anaerobiosis.

Por otro lado, de nuevo en esta parte de la investigación se ha comprobado la gran importancia del medio y condiciones de recuperación, que pueden permitir o no la recuperación de una gran parte de la población, por la interferencia con los sistemas de geminación. La germinación y la recuperación de los esporos tras la aplicación de calor húmedo es un aspecto esencial para la industria alimentaria, pues si no se producen, no se llevará a cabo la alteración del alimento, ni el riesgo de toxiinfecciones. En este estudio se ha demostrado, una vez más (Setlow, 2003), que pese a los avances registrados en las últimas décadas, existen muchas lagunas en el conocimiento de estos aspectos fisiológicos en las especies bacterianas esporuladas, más concretamente en los sistemas de germinación. Estos hechos, de gran importancia práctica y científica, merecen una investigación más profunda.

DISCUSIÓN GENERAL



En este capítulo se resumen los resultados más importantes obtenidos en esta Tesis Doctoral, con objeto de ofrecer una visión conjunta de los distintos capítulos previamente presentados, y de presentar una hipótesis general que permita explicar el comportamiento de *E. coli* frente a los agentes estudiados en esta investigación, y en relación al posible papel del mantenimiento del equilibrio oxidativo.

Tanto las tecnologías utilizadas tradicionalmente en la Industria Alimentaria para la conservación de los alimentos como las nuevas tecnologías desarrolladas a lo largo de los últimos años tienen como objetivo obtener alimentos que cumplan con las características sensoriales y organolépticas demandadas por el consumidor y que, a su vez, sean estables y seguros. Para lograr este último objetivo de manera eficaz inactivar los microorganismos patógenos y alterantes presentes en los alimentos, algunos investigadores están dirigiendo sus estudios hacia el conocimiento de la fisiología celular, de los daños producidos por estas tecnologías en las diferentes estructuras y funciones celulares. Diversos autores han descrito que los microorganismos tratados con tecnologías como el calor, las altas presiones hidrostáticas y la acidez sufren daños a nivel de múltiples estructuras celulares, por lo que a estas tecnologías se les describe como tecnologías “multi-target”(Mackey, 2000; San Martín y

col., 2002; Aertsen y col., 2005; Nguyen y col., 2006; van de Guchte y col., 2002; Richard y Foster, 2004). Por otro lado, es generalmente aceptado que los tratamientos por pulsos eléctricos de alto voltaje generan daños sobre todo a nivel de la membrana citoplasmática ya que estos pulsos producen la electroporación de la misma, lo que puede conllevar la inactivación celular (Mañas y Pagán, 2005). El conocimiento acerca de todos estos modos de acción sigue siendo parcial, y muchos aspectos permanecen sin esclarecer.

Además, actualmente, un nuevo concepto está ganando importancia por ser un posible mecanismo común a todas ellas: el estrés oxidativo (Mols y Abee, 2011). Como ya han descrito otros autores, las células con respiración aerobia están constantemente generando y eliminando especies reactivas del oxígeno de manera equilibrada, pero si esta estabilidad se rompe se produce el desequilibrio entre las sustancias prooxidantes y antioxidantes en favor de las primeras, causando daños a diferentes niveles en el interior celular. No obstante, en condiciones adecuadas, las células disponen de diferentes sistemas de defensa (catalasas, superóxido dismutasas, hidroperoxidasas, etc.) que se encargan de la eliminación de estas ROS y que permiten a la célula recuperarse y crecer de nuevo. Así, por ejemplo, algunos autores han demostrado que el uso de medios de crecimiento con un bajo potencial redox o el uso de atmósferas en ausencia de oxígeno favorecen la recuperación de algunos microorganismos tras su exposición a diferentes agentes. Además, la inactivación de genes involucrados en los sistemas de defensa frente al estrés oxidativo disminuye la resistencia de diferentes microorganismos a los mismos. Sin embargo, el papel del estrés oxidativo frecuentemente se ha infravalorado y no se ha estudiado suficientemente y de manera sistemática.

En esta investigación se planteó la **hipótesis** de que la exposición de las bacterias a agentes utilizados en la conservación de los alimentos podría provocar desequilibrios en el mantenimiento del equilibrio oxidativo, constituyendo un mecanismo común que podría contribuir a la inactivación celular.

Al principio y durante el desarrollo de la investigación se fueron planteando una serie de interrogantes. En primer lugar, ¿se producen incrementos de ROS durante estos tratamientos, en todos ellos?, ¿es por lo tanto el aumento de ROS un evento común y universal en células sometidas a estrés? En caso positivo, ¿cuál es el origen de estas ROS, y qué condiciones favorecen su aparición?

Además, se ha postulado que las especies reactivas del oxígeno pueden generar daños prácticamente en todas las estructuras celulares como son las proteínas y enzimas, el ADN, o las membranas, por lo que, ¿podría haber una relación entre las estructuras dañadas por las

diferentes tecnologías y la presencia de ROS o son fenómenos que no presentan ninguna relación?, ¿el daño a dichas estructuras deriva de la presencia excesiva de ROS o, por el contrario, las ROS se generan precisamente como efecto secundario del daño a determinadas estructuras y funciones celulares?

En relación con todo lo anterior, ¿pueden los microorganismos eliminar con facilidad las ROS presentes en las células tras los tratamientos?, ¿se puede considerar que existe un tipo de daño celular reparable asociado al desequilibrio oxidativo y la presencia de niveles elevados de ROS asociados al tratamiento? Finalmente, ¿el desequilibrio oxidativo es la causa final de muerte celular por parte de estos agentes, es solo uno de los factores que conducen a la misma o constituye simplemente un efecto colateral carente de importancia?

A lo largo del desarrollo de esta Tesis Doctoral se han ido resolviendo algunas de estas cuestiones, y generando nuevas incógnitas. Para avanzar en esta parcela del conocimiento de la fisiología microbiana se han utilizado enfoques experimentales complementarios, utilizando *E. coli* como microorganismo modelo. Entre ellos destaca la determinación directa de la presencia de ROS (Capítulo I) en células sometidas a tratamientos de distinta naturaleza e intensidad (Manuscrito I, Manuscrito III). También se han utilizado enfoques basados en la modificación de las condiciones de tratamiento: aerobiosis y anaerobiosis (Manuscrito II), y presencia/ausencia de compuestos con actividad conocida en el equilibrio redox (Manuscrito I), entre los cuales se ha dedicado especial atención al efecto de la molécula antioxidante glutatión dada su demostrada importancia en la fisiología de las células eucariotas (Manuscrito IV y Manuscrito V). Además, a lo largo de toda la investigación se han realizado estudios dirigidos a comparar la reparación celular en condiciones experimentales que pueden considerarse de alto y bajo nivel de estrés oxidativo. Por otro lado, todos estos estudios encaminados a discernir el papel del estrés oxidativo en la inactivación y/o supervivencia celular se complementaron con experimentos llevados a cabo con cepas mutantes en genes específicos (Manuscrito III, Manuscrito V), que pudieran ayudarnos a interpretar los resultados obtenidos, y con determinaciones de alteraciones celulares que pudiesen estar relacionadas, añadiendo así información adicional acerca de la fisiología de los microorganismos sometidos a agentes estresantes (permeabilización de la membrana, daño al ADN, agregación de proteínas citoplasmáticas) (Manuscrito III, Manuscrito IV).

Como primera aproximación se estudió la presencia de niveles elevados de ROS en *E. coli* tratado por calor. Los resultados obtenidos se incluyen en el Manuscrito I y demostraron que efectivamente las células sometidas a la acción del calor mostraban niveles elevados de

DISCUSIÓN GENERAL

especies reactivas del oxígeno, en mayor proporción e intensidad conforme se incrementaba la temperatura y el tiempo de exposición (Figura 5.1). En general, y a lo largo de toda la investigación, se ha demostrado que los niveles más elevados de ROS correspondían siempre a mayores letalidades, por lo que inactivación e incremento de ROS podrían estar relacionados.

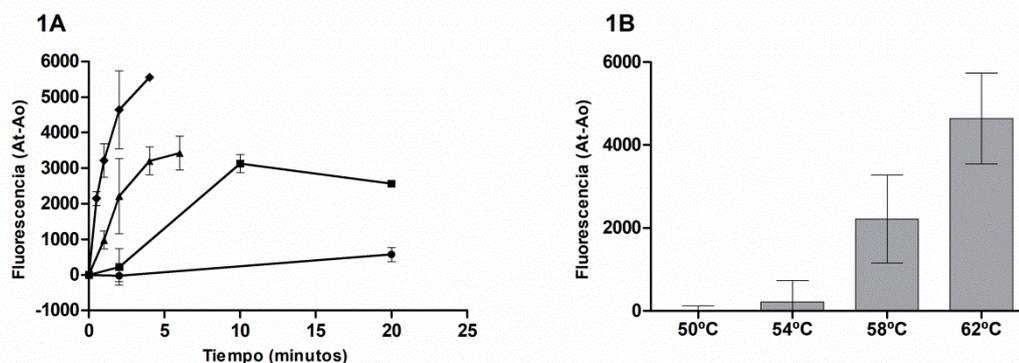


Figura 5.1. Influencia de la temperatura y tiempo de tratamiento en la formación de ROS (tinción con DHE) en células de *E. coli* BW25113 tratadas térmicamente: (A) fluorescencia total a lo largo de los tratamientos a 50°C (●), 54°C (■), 58°C (▲) y 62°C (◆); y (B) fluorescencia total tras 2 minutos de tratamiento.

Además, se exploró el efecto de la adición de diferentes sustancias con actividad redox y de diferentes condiciones de recuperación con distinto nivel de estrés oxidativo en la termorresistencia. De los resultados obtenidos destacaban varios aspectos: que la presencia de un secuestrante de radical superóxido (tiron) y de glutatión ejercía un efecto protector sobre *E. coli* durante el tratamiento, a la vez que producía un descenso en la tinción con DHE; y que la recuperación en condiciones de bajo estrés oxidativo (medio mínimo-cisteína anaerobiosis), favorecía la supervivencia celular tras el calentamiento. Algunos de estos aspectos fueron desarrollados con mayor profundidad a lo largo de la investigación.

Estos primeros resultados confirmaban que efectivamente la exposición de *E. coli* a un agente estresante, en este caso el calor, provocaba alteraciones en el equilibrio oxidativo, que parecían estar de un modo u otro relacionadas con la inactivación y/o supervivencia celular. El origen de las ROS quedaba por determinarse.

Con objeto de aportar información acerca del origen de las ROS detectadas en las células tratadas por calor, se llevó cabo un estudio en el cual se determinó la intensidad de tinción con dihidroetidio en células de *E. coli* crecidas y tratadas en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, para poder comparar la influencia de la presencia y ausencia de respiración

aerobia, y con ello de una cadena de transporte de electrones activa. Además, de manera complementaria se utilizaron también células en fase exponencial, asumiendo una mayor actividad respiratoria en estas últimas, y células de *L. plantarum*, carentes de una cadena de transporte de electrones completa. Es importante destacar que la tinción con DHE es indicativa de presencia de niveles elevados de especies reactivas, con cierta especificidad por el radical anión superóxido (Zielonka y Kalyanaraman, 2010).

De esta parte de la investigación (Manuscrito II), se desprende que el grado de generación de especies reactivas en el interior celular es dependiente de la atmósfera de crecimiento y tratamiento. Además, la fase de crecimiento en la que se encuentra el microorganismo también influiría en la mayor o menor generación de ROS en el interior celular (Figura 5.2). Como se puede observar en la figura, en primer lugar la presencia de niveles elevados de ROS dependió del microorganismo estudiado. Así, para las células crecidas y tratadas en presencia de oxígeno, *E. coli* presentó mayor intensidad de tinción con DHE que *L. plantarum*. Este efecto se podría atribuir a las características metabólicas de estos microorganismos, ya que *L. plantarum* se trata de un microorganismo anaerobio, aunque aerotolerante, con metabolismo predominantemente fermentativo, por lo que carece de una cadena de transporte de electrones completa. Además, las células de *E. coli* en fase exponencial presentaron un mayor grado de tinción en comparación a las células en fase estacionaria. Todos estos resultados confirmarían el papel de la cadena de transporte de electrones en la presencia de niveles elevados de ROS.

No obstante, la presencia de tinción con DHE dependió también de las condiciones atmosféricas a las que se crecieron y trataron ambos microorganismos. Un crecimiento y tratamiento en condiciones de aerobiosis conllevó una mayor tinción. En el caso de *E. coli*, el factor que más incrementó la presencia de tinción fue el tratamiento en presencia de oxígeno, de manera que aquellas células crecidas en anaerobiosis, que *a priori* no están utilizando la cadena de transporte de electrones utilizando oxígeno como aceptor final de electrones, presentaban tinción cuando eran tratadas en presencia de oxígeno. Por lo tanto, se puede concluir que la presencia de niveles elevados de ROS está influida positivamente por la respiración aerobia activa, pero existen mecanismos alternativos. De hecho, otros autores han propuesto que la autooxidación de determinados enzimas podría tener más importancia en la presencia de ROS en el interior celular (Imlay y Fridovich, 1991).

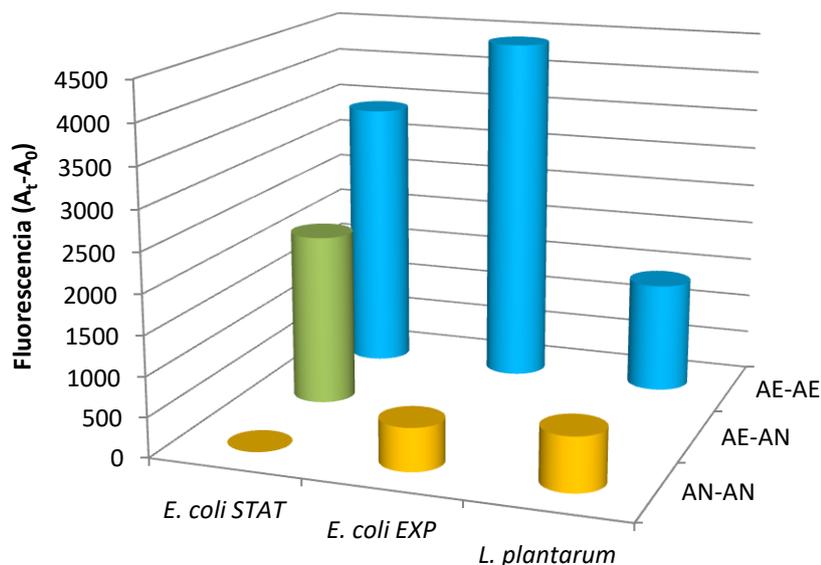


Figura 5.2. Fluorescencia (A_t-A_0) obtenida al teñir con DHE en *E. coli* BW25113, en fase estacionaria (STAT) y exponencial (EXP) y *L. plantarum* tras el crecimiento y tratamiento (58°C) en condiciones de aerobiosis (AE) y/o anaerobiosis (AN) (crecimiento-tratamiento).

Los estudios llevados a cabo con otras tecnologías pretendían determinar dos aspectos fundamentalmente: si los desequilibrios oxidativos se producen de manera universal, y si, en caso positivo, éstos están de un modo u otro relacionados con la inactivación celular.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han demostrado que efectivamente se producen desequilibrios en la homeostasis oxidativa en células de *E. coli* sometidas a los cuatro agentes objeto de estudio. Los datos que sostienen esta afirmación son, de manera directa, la detección de niveles elevados de ROS tras los diferentes tratamientos, y, de manera indirecta, la mejor recuperación celular en condiciones de bajo nivel de estrés oxidativo en células tratadas por calor, HHP, PEAV y acidez (Manuscritos I y III). El hecho de que cuatro tecnologías de tan diferente naturaleza provoquen desequilibrios oxidativos sustenta la hipótesis de que posiblemente se produce de manera universal en las células sometidas a estrés. No obstante, la magnitud e importancia relativa de estos desequilibrios en la supervivencia celular parece depender del agente estudiado.

El **tipo y orden de aparición de las ROS** indica la existencia de vías diferentes para su producción y control en las células, dependiendo del agente aplicado. La Figura 5.3 ilustra la cantidad relativa de presencia de tinción con DHE y con HPF en células de *E. coli* BW25113 tratadas por las cuatro tecnologías, y el orden relativo de aparición, evaluado a través de

tinciones dobles (Manuscrito III). Mientras que en las células tratadas por calor, APH y PEAV, la proporción relativa de células que presentaba tinción con cada colorante era parecida, de manera que existían más células con tinción con DHE que con HPF. Estos resultados podrían indicar que el orden de aparición de los dos radicales parecía ser superóxido→hidroxilo, para las células tratadas por calor, APH y PEAV; lo cual confirmaría los hallazgos descritos por otros autores (Farr y Kogoma, 1991; Imlay, 2003; Lushchak, 2014).

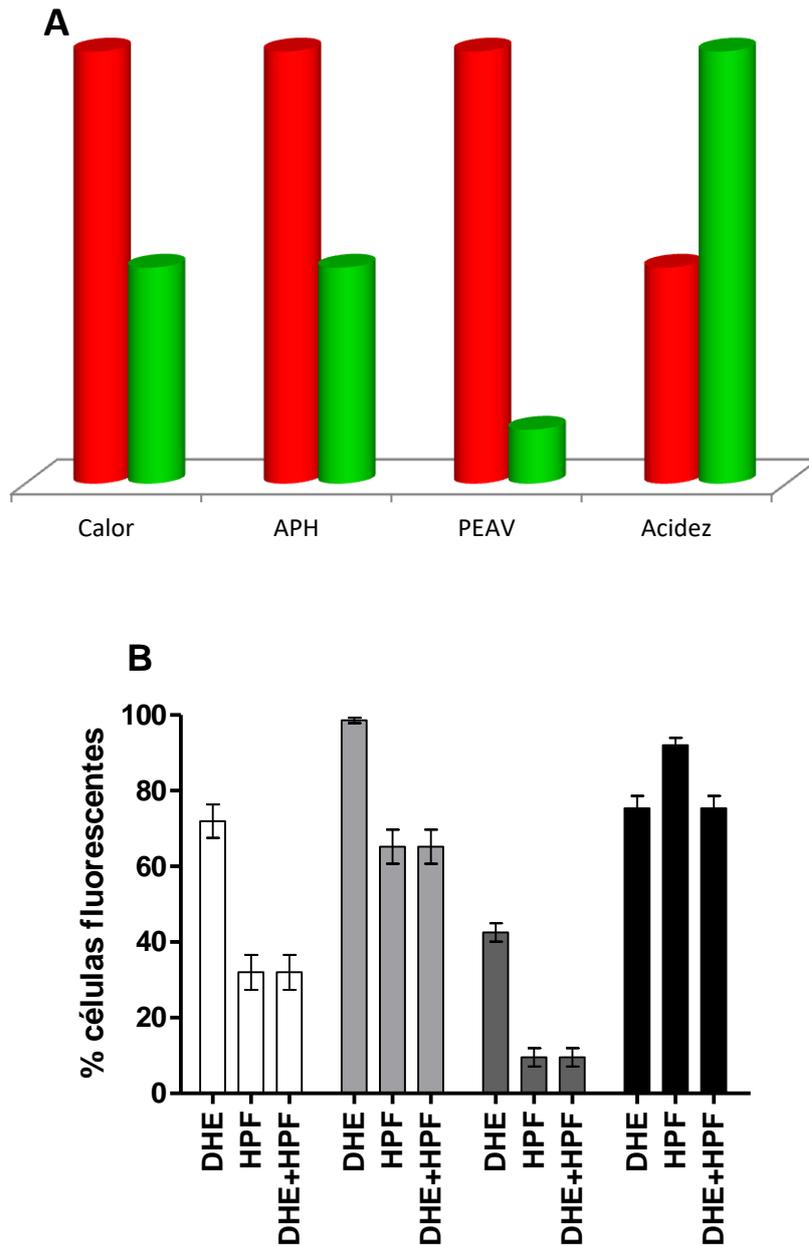


Figura 5.3. Presencia relativa de los ROS (A) y porcentaje de células fluorescentes tras una tinción doble (DHE+HPF) (B) de *E. coli* tras el tratamiento con calor (58 °C/1 min), APH (300 MPa/8 min), PEAV (20kV/cm/30 μs) y acidez (pH 3.0/30 min) mediante la tinción con DHE (rojo) y HPF (verde).

DISCUSIÓN GENERAL

En el caso de la acidez, sin embargo, el orden de aparición de tinción era el opuesto. Estas evidencias parecen indicar que los mecanismos celulares por los que se producen los ROS son distintos en el caso particular de la acidez, caso en el cual el radical hidroxilo aparece antes y en mayor cantidad. También podrían indicar que los sistemas defensivos frente al radical hidroxilo se podrían ver particularmente afectados por la exposición a la acidez, por ejemplo podría darse el caso de que la acidez desnaturalizase de manera más eficiente proteínas fijadoras de hierro, incrementándose así la reacción de Fenton, con la consiguiente generación de radicales hidroxilo. En cualquier caso, la consecuencia celular más importante es que el ADN de las células tratadas por acidez se daña en gran magnitud (figura 5.4), hecho muy probablemente relacionado con la presencia elevada de radicales hidroxilo, altamente tóxicos para el ADN.

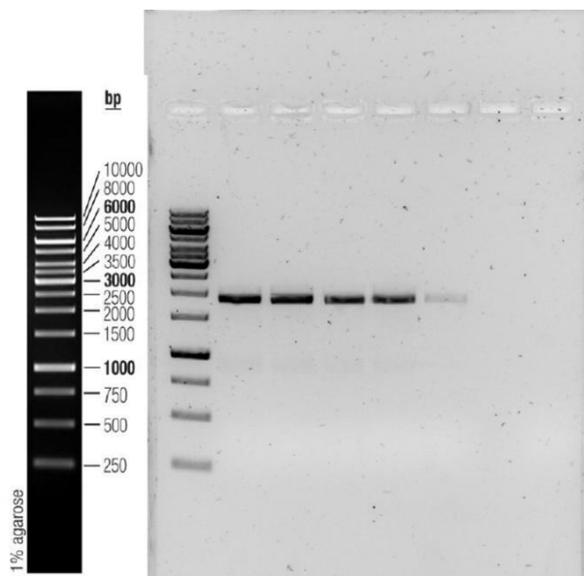


Figura 5.4. Electroforesis de un fragmento amplificado de 1860pb de ADN extraído de células de *E. coli* BW25113 nativas y tratadas con calor (58°C/3 min), APH (300 MPa/8 min), PEAV (20 kV/cm/225 μ s) y acidez (pH 3,0/60 min) a equivalente letalidad (1,7 \pm 0,3 ciclos log). Las muestras aparecen en el siguiente orden, de izquierda a derecha: marcador de ADN, células nativas, calor, APH, PEAV y acidez.

Además, el estudio del nivel de **recuperación celular** en diferentes condiciones evidenció que las células se recuperaban siempre mejor en medio mínimo-cisteína anaerobiosis. La figura 5.5 muestra la comparación del área bajo la curva de las gráficas de supervivencia correspondientes a la recuperación en TSAYE-aerobiosis y en MM-cys-anaerobiosis. Esta relación permite estimar la importancia de las condiciones de bajo estrés oxidativo en la recuperación celular tras el tratamiento, y como se puede observar, fue claramente menor en

el caso de los PEAV. Los datos correspondientes a los tratamientos de acidez no pueden mostrarse, ya que ni siquiera se obtuvo inactivación en MM-cys-anaerobiosis, con lo cual el área bajo la curva puede considerarse 0. Por lo tanto, en este caso, la recuperación celular también se vio claramente mejorada bajo estas condiciones. Estos resultados indicaban que en el caso de los PEAV, el componente oxidativo tendría, pese a la evidente presencia de ROS, una menor importancia, al menos durante el período de recuperación tras el tratamiento. Los datos complementarios obtenidos respecto a la implicación de otras estructuras celulares apoyaban esta hipótesis, como se discute a continuación.

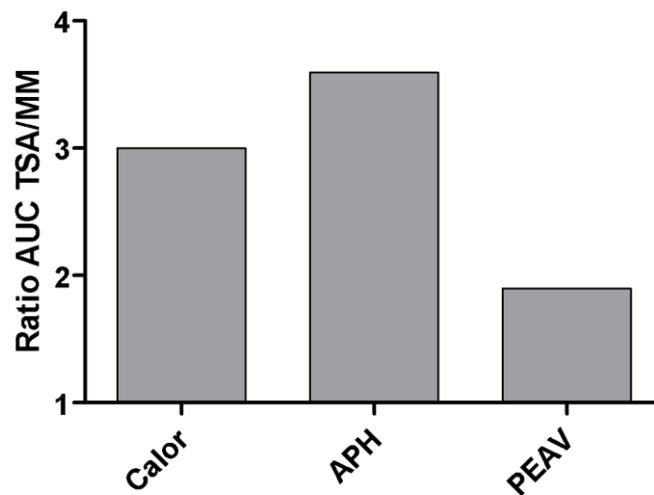


Figura 5.5. Influencia de las condiciones de recuperación en condiciones de bajo estrés oxidativo: ratio área bajo la curva (TSA/MM) de la inactivación de *E. coli* BW25113 para cada tratamiento aplicado.

El estudio de la **posible relación entre el estrés oxidativo y la inactivación celular** se llevó a cabo mediante la determinación a través del microscopio de fluorescencia del porcentaje de células con tinción positiva para ROS (tinción con DHE y/o HPF) y el porcentaje de inactivación celular, siempre utilizando una escala lineal para realizar comparaciones adecuadas, y dentro del primer 1,5 ciclos Log de inactivación, con las dificultades metodológicas que ello conlleva. Esta parte de la investigación se complementó determinando también la permeabilización celular al yoduro de propidio, siguiendo el mismo enfoque experimental. El estudio del daño a la membrana citoplasmática presentaba un interés especial, en primer lugar porque son muchos los autores que de manera sistemática relacionan la muerte celular por diversas tecnologías con el daño a la membrana, y en segundo lugar, por el hecho ya comentado de la posible relación entre el daño a la membrana y la generación de niveles elevados de ROS.

DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados obtenidos en esta Tesis han mostrado que, excepto en el caso particular de las células tratadas por PEAV, el porcentaje de células permeabilizadas al yoduro de propidio (PI) siempre fue notablemente inferior al de células con presencia de ROS (Manuscrito III) (Figura 5.6).

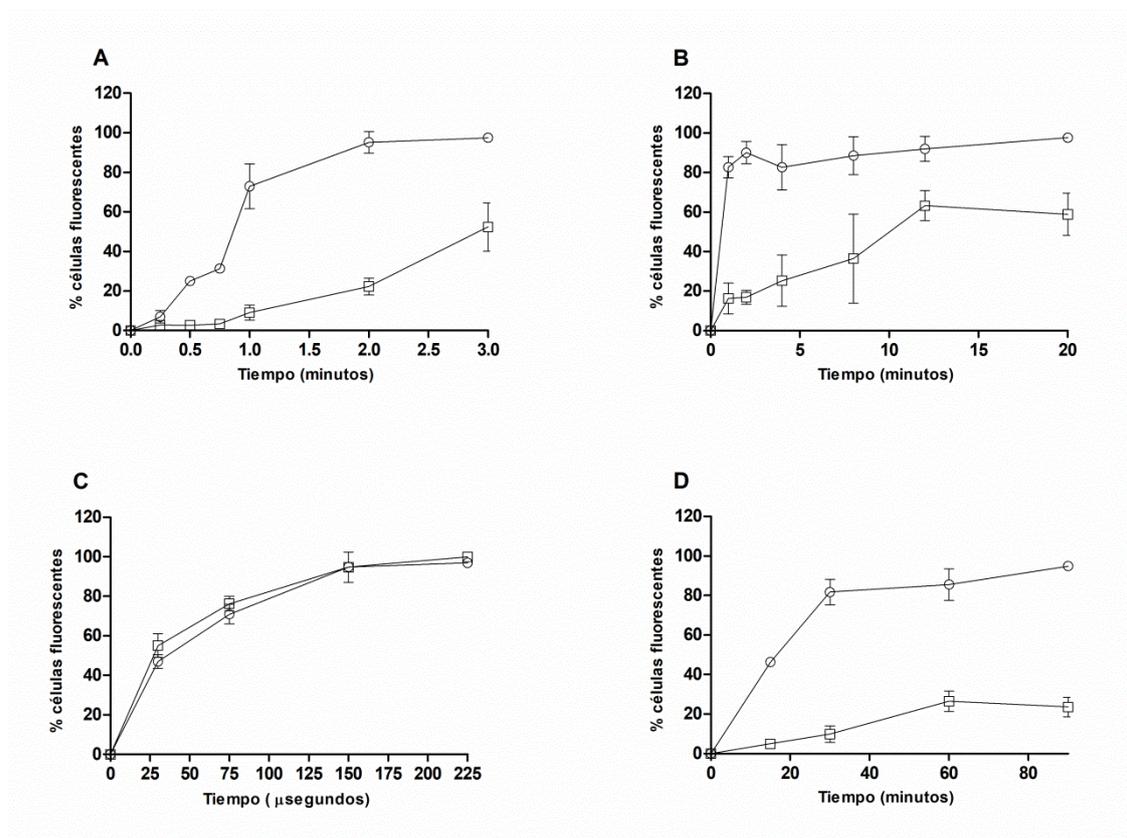


Figura 5.6. Porcentaje de células teñidas con DHE (○) y PI (□) de *E. coli* BW25113 a lo largo del cada tratamiento aplicado: calor (58°C) (A), APH (300 MPa) (B), PEAV (20 kV/cm) (C) y acidez (pH 3.0) (D).

En el caso de los PEAV, la permeabilización de la membrana al IP y la formación de radicales superóxido presentaban un nivel similar, lo que podría indicar que precisamente el elevado daño en la membrana podría ser la causa de la aparición de los radicales superóxido. Esta teoría no sería válida en el caso de las otras tecnologías. No obstante, no se puede descartar la idea de que pequeñas alteraciones de la membrana, como por ejemplo las que se detectan mediante la recuperación en medio selectivo TSAEL-NaCl, estuvieran relacionadas con un incremento en los niveles de ROS. De hecho, el porcentaje de células con tinción con DHE se aproximaba al de células incapaces de crecer en TSAE-NaCl (Figura 5.7).

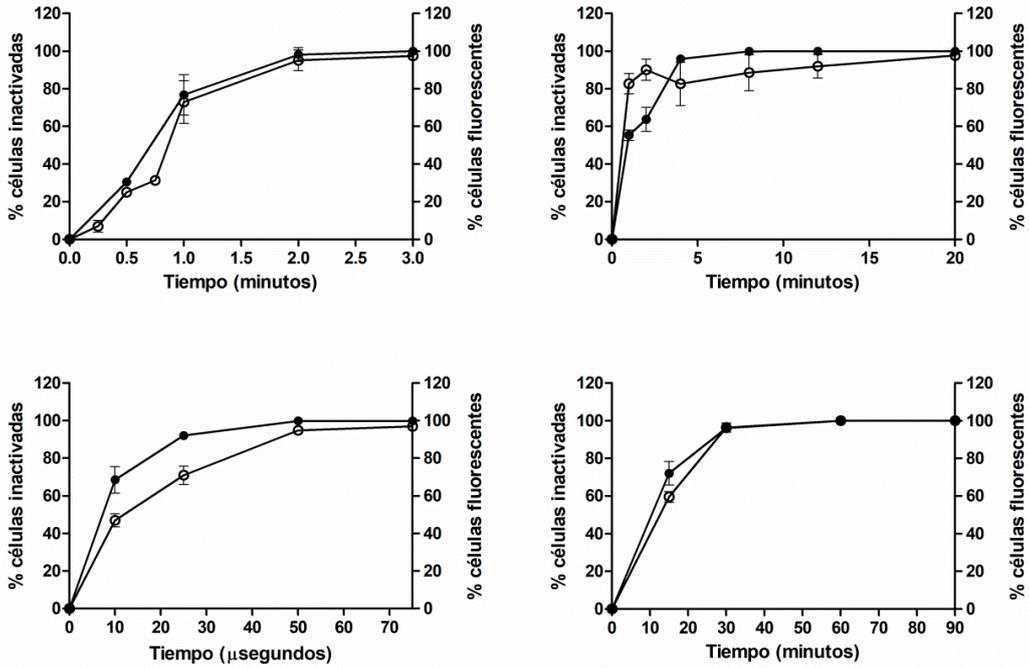


Figura 5.7. Comparación entre el porcentaje de células inactivadas y recuperadas en TSAEL-NaCl y el porcentaje de células con ROS tras el tratamiento de *E. coli* BW25113 con calor (58°C), APH (300 MPa) PEAV (20 kV/cm) y acidez (pH 3,0).

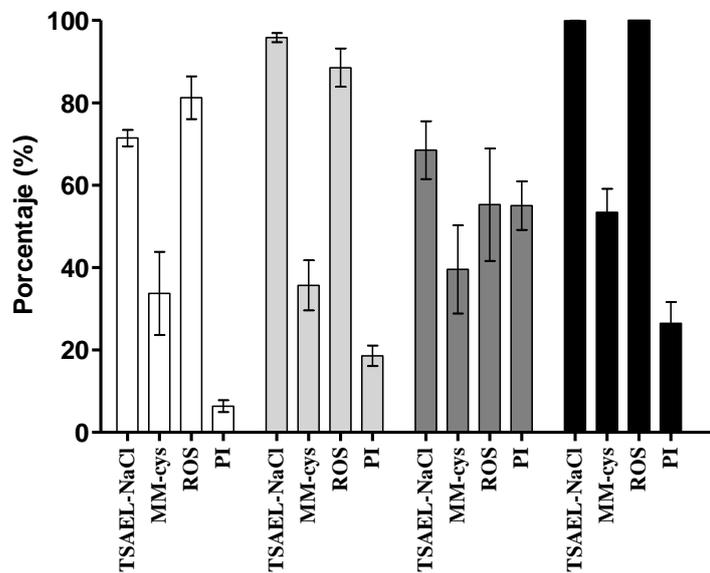


Figura 5.8. Comparación entre el porcentaje de células inactivadas y recuperadas en TSAEL-NaCl y MM-cys y el porcentaje de células con ROS y la membrana permeabilizada (PI) tras el tratamiento de *E. coli* BW25113 con diferentes tecnologías: calor (58°C/1 min) (barras blancas), APH (300 MPa/4 min) (barras gris claro), PEAV (20 kV/cm/30 μs) (barras gris oscuro) y acidez (pH 3,0/60 min) (barras negras).

Estos resultados parecían indicar que las células con presencia de niveles elevados de ROS como consecuencia del tratamiento presentaban invariablemente daños en la membrana, que hacían que no fuesen capaces de crecer en presencia de NaCl. No obstante, hemos de considerar que nuestros resultados han mostrado que estos daños serían reparables en alto grado, sobre todo en las condiciones de recuperación de bajo nivel de estrés oxidativo (MM-cys-anaerobiosis, Fig 5.8), excepto en el caso particular de las células tratadas por PEAV, caso en el que los fenómenos de reparación son menos importantes, al menos en las condiciones experimentales y microorganismo aquí utilizado.

Es importante tener en cuenta que la pérdida de los mecanismos de defensa celulares durante el propio tratamiento, podría también jugar un papel importante, tanto en la supervivencia durante el mismo como en la reparación posterior. Entre ellos cabría destacar los componentes antioxidantes como el glutatión o los enzimas protectores, como la superóxido dismutasa, la catalasa, etc. Además, también la desnaturalización de proteínas fijadoras de hierro, podría aumentar los niveles de radicales hidroxilo, mediante la reacción de Fenton intracelular. Los datos obtenidos acerca de la agregación de proteínas intracitoplasmáticas, complementados con los obtenidos con cepas mutantes en el gen *dnaK*, responsable de la síntesis de una de las chaperonas celulares más abundantes, revelaron que era en el caso de las APH en el que existía un mayor grado de afectación de las proteínas (Manuscrito III), aunque también en el caso del calor se detectaba cierto grado de agregación proteica.

De los resultados obtenidos con las cuatro tecnologías también se puede concluir, que aunque en todos los casos se produce cierto grado de daño en la membrana, únicamente se puede establecer una relación directa entre el grado de permeabilización al yoduro de propidio, que podría considerarse como un indicador de daño severo, y la inactivación celular, en el caso de los PEAV. En el resto de tecnologías, la permeabilización severa se produciría en células ya incapaces de crecer incluso en las mejores condiciones de recuperación estudiadas.

A modo de resumen, la tabla 5.1 muestra los principales eventos celulares observados en células tratadas por cada agente, con el fin de analizar y comparar las principales causas que intervendrían en la muerte celular cuando *E. coli* es expuesto a tratamientos por calor, APH, PEAV y acidez (Manuscrito III). Su importancia relativa se indica mediante una escala semicuantitativa.

Tabla 5.1. Principales eventos celulares observados al exponer a las células de *E. coli* BW25113 a tratamientos por calor (58 °C), APH (300 MPa), PEAV (20 kV/cm) y acidez (pH 3,0).

	Calor	APH	PEAV	Acidez
Presencia de ROS generales	+++	+++	+++	+++
Presencia de radical hidroxilo	+	+	+	+++
Permeabilización PI	+	+	+++	+
Daño al ADN	++	+	+	+++
Daño a las proteínas	++	+++	+	+
Daño subletal membrana	++	++	+/-	+++
Daño subletal oxidativo	+++	+++	-/-	++

Un análisis de los datos contenidos en la tabla revela que los mecanismos involucrados en la inactivación por calor y por APH podrían ser comunes en gran medida, si bien en las APH la alteración de las proteínas presentaría mayor relevancia, hecho evidenciado de manera directa por el mayor grado de agregación proteica observado en el citoplasma, e indirectamente, por la mayor sensibilidad a las APH de un mutante carente de proteína DnaK. En estas dos tecnologías, las ROS podrían generarse de forma similar y jugar un papel parecido durante la recuperación tras el tratamiento.

Para las células tratadas por acidez, sin embargo, las vías de aparición y/o control de los ROS parecen ser distintas a las otras tecnologías, y en este caso, se observa un daño importante al ADN, probablemente causado por los radicales hidroxilo, que no aparece en el resto de tratamientos. Este daño se confirmó directamente mediante una técnica de amplificación de ADN, y también indirectamente mediante el uso de cepas mutantes en el gen *recA*, relacionado con la reparación del ADN. En cualquier caso, se puede afirmar que en las células tratadas por estas tres tecnologías, se generan desequilibrios oxidativos que afectan a la supervivencia celular, durante el tratamiento y la recuperación posterior.

Finalmente, en el caso de los PEAV, en nuestra opinión, dada la diferencia observada con las células tratadas por las otras tres tecnologías, muy probablemente la presencia elevada de ROS, además de que podría derivar del daño masivo en la membrana, presentaría una importancia secundaria en la supervivencia celular.

En esta Tesis se dedicó un atención especial al estudio del efecto del glutatión en la supervivencia celular, bien añadido exteriormente o bien incrementando su síntesis

DISCUSIÓN GENERAL

intracelular mediante la manipulación genética (Manuscritos IV y V). Dada su gran importancia como antioxidante se estudió si su presencia, no sólo durante la recuperación, sino durante el tratamiento, ejercía un papel protector en la inactivación de diferentes microorganismos. Así, la figura 5.9 muestra la inactivación observada tras el tratamiento térmico (58 °C/5 min) de *E. coli* en presencia de glutatión (10 mM) en el medio de tratamiento y de recuperación.

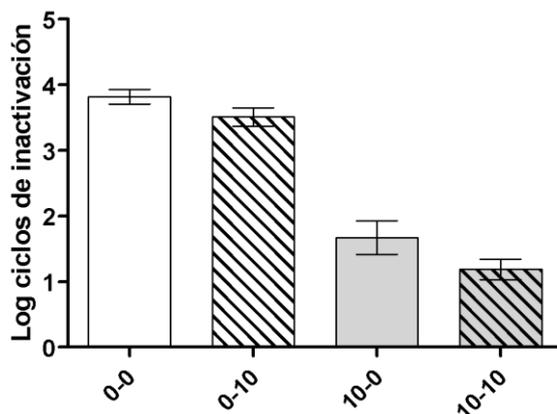


Figura 5.9. Log₁₀ de ciclos de inactivación de *E. coli* BW25113 tratado a 58°C durante 5 minutos en PBS con (barras grises; 10-0, 10-10) o sin glutatión (barras blancas; 0-0,0-10). Las células fueron recuperadas en TSAEL con (barras rayadas; 0-10, 10-10) o sin glutatión añadido (barras lisas; 0-0; 0-10).

Estos resultados mostraron que la presencia de glutatión en el medio de tratamiento presentaba un papel protector frente a la inactivación por calor de este microorganismo. Este papel protector, que puede hacerse extensivo a otros microorganismos como *S. enterica* y *L. plantarum* (Manuscrito IV), parecía estar ligado a una termoestabilización de las principales estructuras celulares, tales como las membranas y las proteínas, incluyendo enzimas de interés como la superóxido dismutasa. De hecho, también se observó que la presencia de radical superóxido disminuía notablemente cuando las células se trataban en presencia de glutatión. El efecto termoestabilizador del glutatión sobre la fracción proteica celular fue de gran relevancia (Figura 5.10). Los datos de los que disponemos no nos permiten discernir si la menor presencia de ROS en estas células es consecuencia de la termoestabilización de la membrana y/o de proteínas implicadas en su eliminación, por ejemplo la SOD, o si por el contrario, las proteínas y/o la membrana se ven protegidas frente al calor porque el glutatión quela las ROS que se fuesen formando en exceso en las células. La molécula de glutatión se ha demostrado con capacidad de quelar radicales libres y también de preservar la estructura de las proteínas mediante intercambios tiol-disulfuro con proteínas alteradas (Carmel-Harel y Storz, 2000).

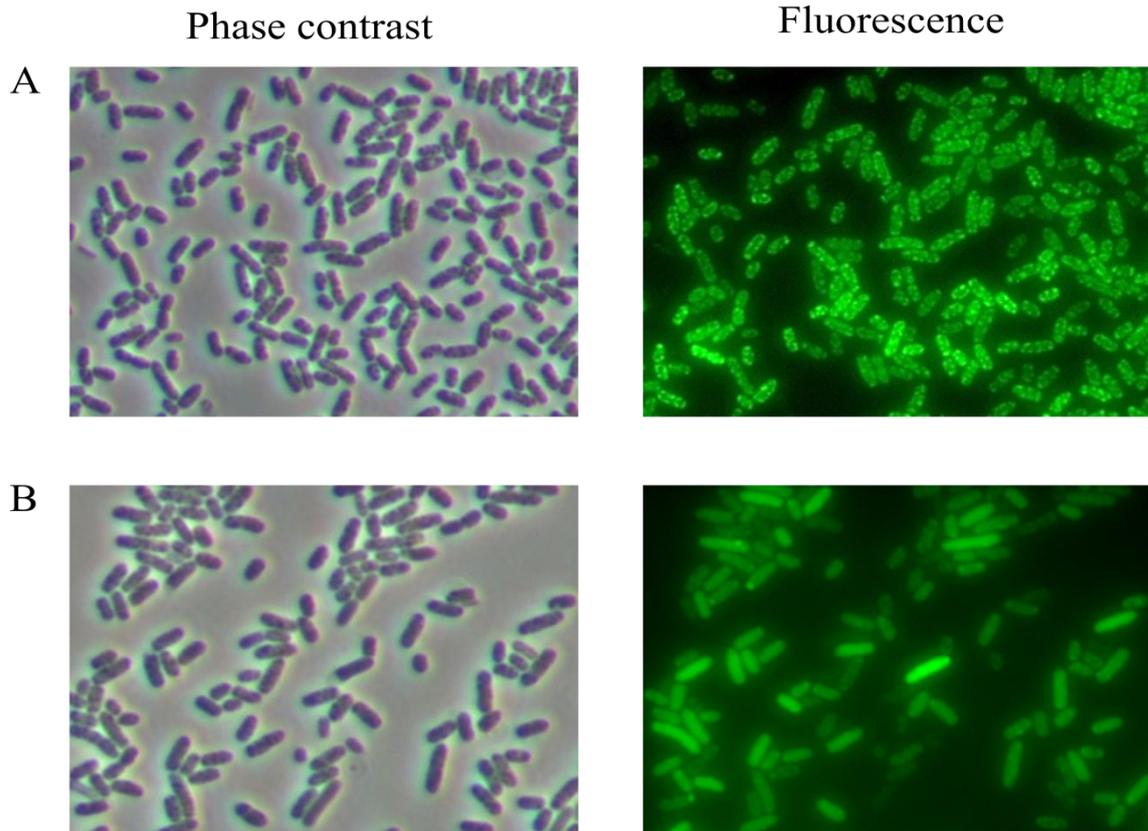


Figura 5.10. Agregados proteicos en *E. coli* tratado por calor (58°C/10 min) en ausencia (A) o presencia (B) de glutatión añadido.

Estos resultados se confirmaron al utilizar una cepa que sobreexpresaba el gen *gshF*, responsable de la síntesis de glutatión. Esta cepa presentó una concentración de glutatión intracelular un 31% superior a su cepa parental, y su resistencia al calor fue superior a la de la cepa parental de la que provenía. Los resultados obtenidos con la cepa mutante sobreproductora de glutatión también mostraron que el efecto protector se manifestaba al exponer las células a la acción de las temperaturas y condiciones de acidez letales, pero no durante la exposición a condiciones de estrés subletal (crecimiento bajo diversas condiciones desfavorables) ni al exponer las células a la acción letal de los PEAV ni APH.

De hecho, en este estudio se ha observado que el efecto protector del glutatión añadido externamente frente a los tratamientos térmicos depende de la concentración, de manera que una vez superado cierto umbral, puede ejercer un efecto sensibilizador (Manuscrito IV, Manuscrito V, Figura 5.11). Además en el caso particular de las altas presiones, el glutatión añadido externamente no solo no protege a las células sino que las sensibiliza frente al tratamiento. Estos hechos podrían deberse a la incapacidad celular para mantener un correcto equilibrio GSH/GSSG, por la pérdida de actividad de los enzimas responsables de su

mantenimiento, como la glutatión reductasa, por efecto del tratamiento. Es razonable pensar que este efecto se manifestaría bajo condiciones de elevadas concentraciones de glutatión. También, en el caso de las altas presiones, es posible que el glutatión ejerza un efecto sensibilizador debido a la reactividad de su grupo tiol, como se ha demostrado con otros compuestos, interaccionando con proteínas desplegadas por efecto de la presurización (Feyaerts y col., 2015).

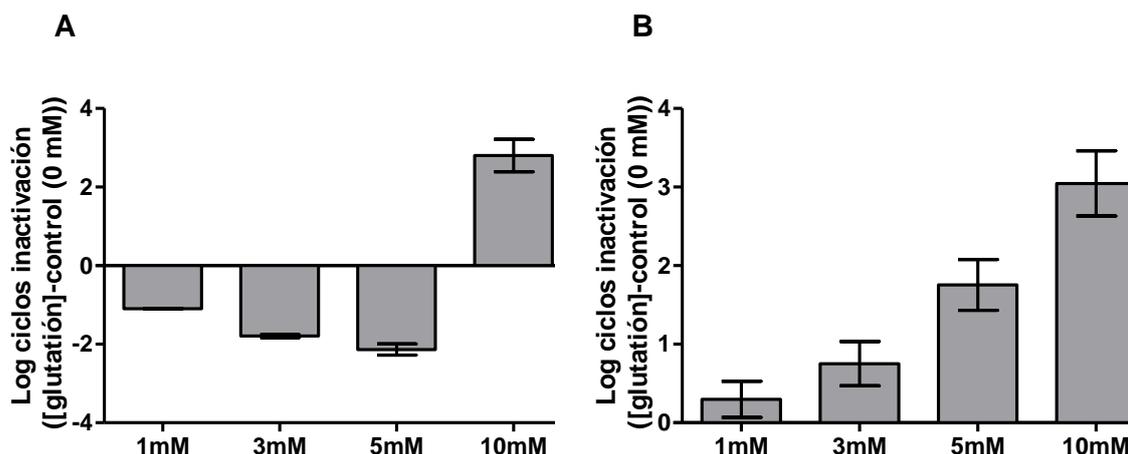


Figura 5.11. Efecto de diferentes concentraciones de glutatión (1, 3, 5, 10 mM) en la inactivación de *E. coli* MG1655 tratado con calor (58°C/15 min) (A) y con APH (500 MPa/15 min). Los resultados representan la diferencia entre los ciclos Log₁₀ de inactivación de cada concentración y los ciclos Log₁₀ de inactivación del tratamiento control (0 mM de glutatión).

En cualquier caso, los resultados obtenidos en relación al glutatión y los tratamientos térmicos vuelven a poner de manifiesto que en general, aquellos tratamientos que provocan una mayor letalidad son aquellos que provocan un mayor aumento de ROS intracelulares. También, de manera invariable, la recuperación en condiciones de bajo nivel de estrés oxidativo (MM-cys-anaerobiosis), mejora la supervivencia de manera notable.

En resumen, todos los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral indican que los tratamientos tecnológicos provocan la aparición de niveles elevados de diferentes ROS en las células, en mayor intensidad tras tratamientos más severos, y por lo tanto se trata de un síntoma claro y universal de daño celular. Estos fenómenos parecen tener más relevancia en el caso del calor, la acidez y las altas presiones que en los pulsos eléctricos de alto voltaje. También es importante no perder de vista que, bajo todas las condiciones experimentales estudiadas, las células son capaces de recuperarse si las condiciones son adecuadas. La recuperación en medio mínimo-cisteína-anaerobiosis da lugar a porcentajes de supervivientes muy superiores a

los obtenidos en medio complejo y aerobiosis, y ello podría estar relacionado con la capacidad celular de evitar la formación y/o eliminar más eficientemente las ROS formadas, evitando daños adicionales en las estructuras celulares.

CONCLUSIONES



- 1** Las células de *E. coli* tratadas por calor presentan niveles elevados de especies reactivas del oxígeno tras el tratamiento, en mayor cuantía conforme se incrementa la intensidad del mismo, tanto en tiempo como en temperatura. De manera general, aquellas condiciones de tratamiento que dan lugar a mayores niveles de ROS son también aquellas que consiguen un mayor efecto letal.
- 2** La presencia de oxígeno durante el crecimiento y tratamiento térmico de las células de *E. coli* provoca la aparición de niveles más elevados de especies reactivas del oxígeno. Aunque la aparición de ROS es más relevante en células en respiración aerobia activa, las alteraciones en la cadena de transporte de electrones no son la única vía a partir de la que se generan.
- 3** La exposición de las células de *E. coli* a las altas presiones hidrostáticas (APH), los pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV) y la acidez también provoca la aparición de niveles elevados de especies reactivas del oxígeno, y también de manera progresiva a lo largo del tiempo de tratamiento.
- 4** En las células tratadas por acidez, el radical hidroxilo se genera en mayor cantidad que en las tratadas por calor, APH y PEAV, lo cual podría estar relacionado con el mayor daño al ADN detectado en aquellas.
- 5** No se puede establecer una relación directa entre el daño a la membrana, estimada mediante la captación de yoduro de propidio, y la presencia de niveles elevados de ROS, excepto en el caso particular de las células tratadas por PEAV.
- 6** La utilización de condiciones de menor estrés oxidativo tras el tratamiento por las cuatro tecnologías, medio mínimo con cisteína y condiciones de anaerobiosis, mejora la recuperación de las células de *E. coli*. Este efecto es muy notable en el caso del calor, las APH y la acidez, y menos relevante en el caso de los PEAV, probablemente debido a la menor influencia del componente oxidativo en la inactivación celular por esta tecnología.

7

La presencia de glutatión en el medio de calentamiento protege a las células de *E. coli*, *S. enterica* y *L. plantarum* frente a la inactivación por calor. El efecto del glutatión añadido externamente depende de la concentración, ya que superado un cierto umbral puede ejercer un efecto sensibilizador.

8

En las células de *E. coli* sometidas a tratamiento térmico, el glutatión provoca una estabilización de las membranas, de las proteínas celulares, incluyendo enzimas como la superóxido dismutasa, y un menor nivel de ROS tras el tratamiento.

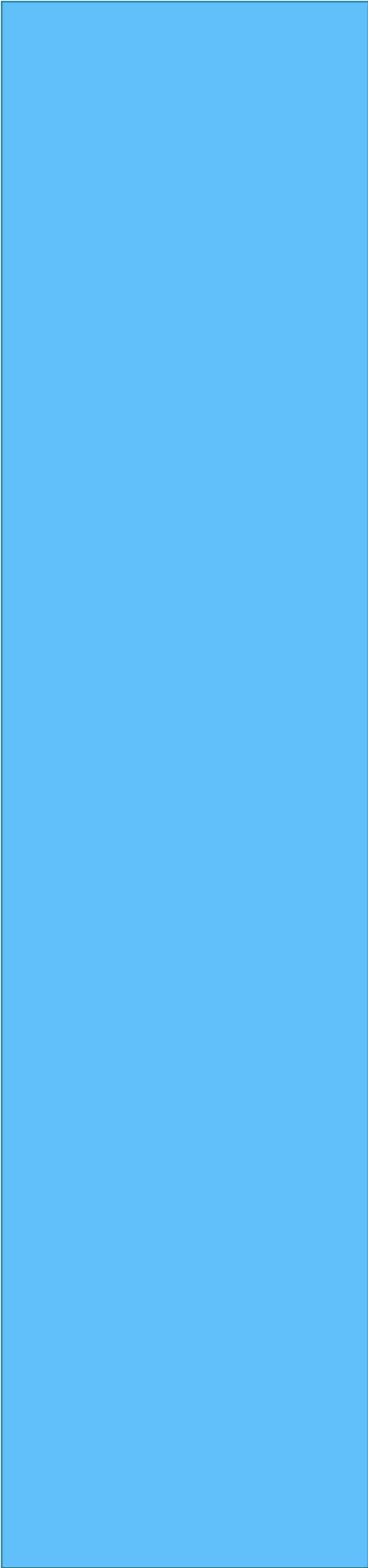
9

La presencia de mayor contenido de glutatión intracelular en *E. coli*, conseguido mediante la sobreexpresión del gen *gshF*, protege a las células frente a la inactivación por calor y acidez, pero no frente a la inactivación por PEAV ni APH. De hecho, el glutatión añadido en el medio de presurización ejerce un efecto sensibilizador.

10

La recuperación de los esporos de *B. subtilis* tras el tratamiento térmico en medio mínimo determina en gran medida el número de supervivientes capaces de crecer. Este efecto parece estar relacionado con los fenómenos de germinación de los esporos.

BIBLIOGRAFÍA



- Abraham, G., Debray, E., Candau, Y. y Piar, G. 1990. Mathematical model of thermal destruction of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Applied and Environmental Microbiology*. 56(10), 3073-3080.
- Adamčík, J., Víglasky, V., Valle, F., Antalík, M., Podhradsky, D. y Dietler, G. 2002. Effect of bacteria growth temperature on the distribution of supercoiled DNA and its thermal stability. *Electrophoresis*. 23, 3300-3309.
- Aertsen, A., De Spiegeleer, P., Vanoirbeek, K., Lavilla, M. y Michiels, C. W. 2005. Induction of oxidative stress by high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(5), 2226-2231.
- Aertsen, A. y Michiels, C. W. 2008. Cellular impact of sublethal pressures on *Escherichia coli*. En: *High-pressure microbiology* (Michiels, C. W., Bartlett D.H., Aertsen, A. eds.), pp. 87-100. American Society of Microbiology.
- Aertsen, A., Van Houdt, R., Vanoirbeek, K. y Michiels, C. W. 2004a. An SOS response induced by high pressure in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 186(18), 6133-6141.
- Aertsen, A., Vanoirbeek, K., De Spiegeleer, P., Sermon, J., Hauben, K., Farewell, A., Nyström, T. y Michiels, C. W. 2004b. Heat shock protein-mediated resistance to high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(5), 2660-2666.
- Alakomi, H. L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K. y Helander, I. M. 2000. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(5), 2001-2005.
- Alimova, A., Katz, A., Gottlieb, P. y Alfano, R. 2006. Proteins and dipicolinic acid released during heat shock activation of *Bacillus subtilis* spores probed by optical spectroscopy. *Applied Optics*. 45(3), 445-450.
- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F. y Ray, B. 2000. Interactions of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. 60(1), 33-42.
- Alpas, H., Lee, J., Bozoglu, F. y Kaletunç, G. 2003. Evaluation of high hydrostatic pressure sensitivity of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 by differential scanning calorimetry. *International Journal of Food Microbiology*. 87(3), 229-237.
- Altenburger, I. 2009. Survey of heat stress response of *Enterococcus faecium* using fluorimetry and flow cytometry. Tesis Doctoral. Universidad de Viena.
- Álvarez-Ordóñez, A., Alvseike, O., Omer, M., Heir, E., Axelsson, L., Holck, A. y Prieto, M. 2013. Heterogeneity in resistance to food-related stresses and biofilm formation ability among verocytotoxigenic *Escherichia coli* strains. *International Journal of Food Microbiology*. 161(3), 220-230.
- Álvarez-Ordóñez, A., Fernández, A., Bernardo, A. y López, M. 2010. Arginine and lysine decarboxylases and the acid tolerance response of *Salmonella Typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*. 136(3), 278-282.
- Álvarez-Ordóñez, A., Fernández, A., López, M., Arenas, R. y Bernardo, A. 2008. Modifications in membrane fatty acid composition of *Salmonella typhimurium* in response to growth conditions and their effect on heat resistance. *International Journal of Food Microbiology*. 123(3), 212-219.
- Álvarez-Ordóñez, A., Fernández, A., Bernardo, A. y López, M. 2009. Heat-resistance prediction of *Listeria innocua* grown at different temperatures. *Journal of Food Safety*. 29(3), 474-483.
- Álvarez, I. 2000. Resistencia al calor y a los ultrasonidos bajo presión de *Salmonella enteritidis* y *Salmonella senftenberg* en medios de distinta actividad de agua. Tesina de licenciatura. Universidad de Zaragoza.
- Álvarez, I. 2002. Inactivación Microbiana por Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.

- Álvarez, I., Condón, S. y Raso, J. 2006a. Microbial inactivation by pulsed electric fields. En: *Pulsed electric fields technology for the food industry* (Raso, J., Heinz, V., eds.), pp. 95-128. Springer Applied Science: New York.
- Álvarez, I., Mañas, P., Virto, R. y Condón, S. 2006b. Inactivation of *Salmonella Senftenberg* 775W by ultrasonic waves under pressure at different water activities. *International Journal of Food Microbiology*. 108(2), 218-225.
- Álvarez, I., Pagán, R., Raso, J. y Condón, S. 2002. Environmental factors influencing the inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *Letters in Applied Microbiology*. 35(6), 489-493.
- Álvarez, I., Raso, J., Palop, A. y Sala, F. J. 2000. Influence of different factors on the inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology*. 55(1), 143-146.
- Álvarez, I., Raso, J., Sala, F. y Condón, S. 2003a. Inactivation of *Yersinia enterocolitica* by pulsed electric fields. *Food Microbiology*. 20(6), 691-700.
- Álvarez, I., Virto, R., Raso, J. y Condón, S. 2003b. Comparing predicting models for the *Escherichia coli* inactivation by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 4(2), 195-202.
- Alwazeer, D., Cachon, R. y Divies, C. 2002. Behavior of *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae* in fresh and thermally processed orange juice. *Journal of Food protection*. 65(10), 1586-1589.
- Alzamora, S. M., Guerrero, S. N., López-Malo, A., Palou, E., Char, C. D. y Raffellini, S. 2009. 4 Models for Microorganism Inactivation: Application in Food Preservation Design. En: *Processing Effects on Safety and Quality of Foods* (Ortega-Rivas, E., ed.), pp. 87-115. CRC Press.
- Allwood, M. y Russell, A. 1967. Mechanism of thermal injury in *Staphylococcus aureus*. I. Relationship between viability and leakage. *Applied Microbiology*. 15(6), 1266-1269.
- Allwood, M. y Russell, A. 1968. Thermally induced ribonucleic acid degradation and leakage of substances from the metabolic pool in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 95(2), 345-349.
- Allwood, M. y Russell, A. 1970. Mechanisms of thermal injury in nonsporulating bacteria. *Advances in Applied Microbiology*. 12, 89-119.
- Amado, I. R., Vázquez, J. A., Guerra, N. P. y Pastrana, L. 2014. Thermal resistance of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from vegetable feed ingredients. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 94(11), 2274-2281.
- Aragao, G. M., Corradini, M. G., Normand, M. D. y Peleg, M. 2007. Evaluation of the Weibull and log normal distribution functions as survival models of *Escherichia coli* under isothermal and non isothermal conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 119(3), 243-257.
- Arku, B., Fanning, S. y Jordan, K. 2011. Flow cytometry to assess biochemical pathways in heat-stressed *Cronobacter* spp.(formerly *Enterobacter sakazakii*). *Journal of Applied Microbiology*. 111(3), 616-624.
- Arneborg, N., Jespersen, L. y Jakobsen, M. 2000. Individual cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* exhibit different short-term intracellular pH responses to acetic acid. *Archives of Microbiology*. 174(1-2), 125-128.
- Aronsson, K., Lindgren, M., Johansson, B. R. y Rönner, U. 2001. Inactivation of microorganisms using pulsed electric fields: the influence of process parameters on *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2(1), 41-54.
- Aronsson, K. y Rönner, U. 2001. Influence of pH, water activity and temperature on the inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2(2), 105-112.

- Aronsson, K., Rönner, U. y Borch, E. 2005. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to membrane permeabilization and subsequent leakage of intracellular compounds due to pulsed electric field processing. *International Journal of Food Microbiology*. 99(1), 19-32.
- Arroyo, C., Cebrián, G., Pagán, R. y Condón, S. 2010. Resistance of *Enterobacter sakazakii* to pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 11(2), 314-321.
- Arroyo, C., Cebrián, G., Pagán, R. y Condón, S. 2012. Synergistic combination of heat and ultrasonic waves under pressure for *Cronobacter sakazakii* inactivation in apple juice. *Food Control*. 25(1), 342-348.
- Arsène, F., Tomoyasu, T. y Bukau, B. 2000. The heat shock response of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*. 55(1), 3-9.
- Aryani, D. C., Den Besten, H., Hazeleger, W. y Zwietering, M. 2015. Quantifying variability on thermal resistance of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 193, 130-138.
- Atluri, S., Ragkousi, K., Cortezzo, D. E. y Setlow, P. 2006. Cooperativity between different nutrient receptors in germination of spores of *Bacillus subtilis* and reduction of this cooperativity by alterations in the GerB receptor. *Journal of Bacteriology*. 188(1), 28-36.
- Augustin, J., Carlier, V. y Rozier, J. 1998. Mathematical modelling of the heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*. 84(2), 185-191.
- Axe, D. D. y Bailey, J. E. 1995. Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 47(1), 8-19.
- Baatout, S., De Boever, P. y Mergeay, M. 2005. Temperature-induced changes in bacterial physiology as determined by flow cytometry. *Annals of Microbiology*. 55, 73-80.
- Baatout, S., Leys, N., Hendrickx, L., Dams, A. y Mergeay, M. 2007. Physiological changes induced in bacteria following pH stress as a model for space research. *Acta Astronautica*. 60(4), 451-459.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L. y Mori, H. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*. 2(1).
- Bagramyan, K., Galstyan, A. y Trchounian, A. 2000. Redox potential is a determinant in the *Escherichia coli* anaerobic fermentative growth and survival: effects of impermeable oxidant. *Bioelectrochemistry*. 51(2), 151-156.
- Baharoglu, Z. y Mazel, D. 2014. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiology Reviews*. 38(6), 1126-1145.
- Bailey-Smith, K., Todd, S. J., Southworth, T. W., Proctor, J. y Moir, A. 2005. The ExsA protein of *Bacillus cereus* is required for assembly of coat and exosporium onto the spore surface. *Journal of Bacteriology*. 187(11), 3800-3806.
- Baird-Parker, A. y Davenport, E. 1965. The effect of recovery medium on the isolation of *Staphylococcus aureus* after heat treatment and after the storage of frozen or dried cells. *Journal of Applied Microbiology*. 28(3), 390-402.
- Balasubramaniam, V., Ting, E., Stewart, C. y Robbins, J. 2004. Recommended laboratory practices for conducting high-pressure microbial inactivation experiments. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 5(3), 299-306.
- Balasubramanian, S. y Balasubramaniam, V. 2003. Compression heating influence of pressure transmitting fluids on bacteria inactivation during high pressure processing. *Food Research International*. 36(7), 661-668.
- Barbosa-Cánovas, G. V., Pothakamury, U. R., Góngora-Nieto, M. M. y Swanson, B. G. 1999. *Preservation of foods with pulsed electric fields*. Academic Press.

BIBLIOGRAFÍA

- Barbosa-Cánovas, G. V. y Altunakar, B. 2006. Pulsed Electric Field Processing of Foods: An Overview. En: *Pulsed Electric Field Technology for the Food Industry* (Raso, J., Heinz, V., eds.), pp. 3-26. Springer Applied Science: New York.
- Barbosa-Cánovas, G. V., Pothakamury, U. R., Palou, E. y Swanson, B. G. 1998. Biological effects and applications of pulsed electric fields for the preservation of foods. En: *Nonthermal Preservation of Foods* (Barbosa-Cánovas, G. V., Pothakamury, U. R., Palou, E. y Swanson, B. G., eds.), pp. 73-112. Marcel Dekker: New York.
- Barbosa-Cánovas, G. V. y Sepúlveda, D. 2005. Present status and the future of PEF technology. En: *Novel Food Processing Technologies* (Barbosa-Cánovas, G. V., Tapia, M. S. y Cano, M. P., eds.), pp. 423-442. CRC Press.
- Barford, D. 2004. The role of cysteine residues as redox-sensitive regulatory switches. *Current Opinion in Structural Biology*. 14(6), 679-686.
- Barnett, A. y Weaver, J. C. 1991. A unified, quantitative theory of reversible electrical breakdown and rupture. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 25(2), 163-182.
- Bazin, M. y Prosser, J. I. 1992. Modelling microbial ecosystems. *Journal of Applied Microbiology*. 73, 89S-95S.
- Belliveau, B. H., Beaman, T. C., Pankratz, H. S. y Gerhardt, P. 1992. Heat killing of bacterial spores analyzed by differential scanning calorimetry. *Journal of Bacteriology*. 174(13), 4463-4474.
- Beney, L. y Gervais, P. 2001. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57(1), 34-42.
- Beney, L., Perrier-Cornet, J.-M., Hayert, M. y Gervais, P. 1997. Shape modification of phospholipid vesicles induced by high pressure: influence of bilayer compressibility. *Biophysical Journal*. 72(3), 1258-1263.
- Benito, A., Ventoura, G., Casadei, M., Robinson, T. y Mackey, B. 1999. Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157 to high hydrostatic pressure, mild heat, and other stresses. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(4), 1564-1569.
- Benov, L. y Fridovich, I. 1995. Superoxide dismutase protects against aerobic heat shock in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 177(11), 3344-3346.
- Berney, M., Weilenmann, H.-U., Ihssen, J., Bassin, C. y Egli, T. 2006. Specific growth rate determines the sensitivity of *Escherichia coli* to thermal, UVA, and solar disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(4), 2586-2593.
- Beuchat, L. 1978. Injury and repair of gram-negative bacteria, with special consideration of the involvement of the cytoplasmic membrane. En: *Advances in Applied Microbiology* (Perlman, D., ed.), Vol. 23, pp. 219-243. Elsevier.
- Beuchat, L. y Lechowich, R. 1968. Effect of salt concentration in the recovery medium on heat-injured *Streptococcus faecalis*. *Applied Microbiology*. 16(5), 772-776.
- Bevilacqua, A., Speranza, B., Sinigaglia, M. y Corbo, M. R. 2015. A focus on the death kinetics in predictive microbiology: benefits and limits of the most important models and some tools dealing with their application in foods. *Foods*. 4(4), 565-580.
- Bigelow, W. y Esty, J. 1920. The thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms. *The Journal of Infectious Diseases*. 27(6), 602-617.
- Bintsis, T., Litopoulou-Tzanetaki, E. y Robinson, R. K. 2000. Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry—a critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80(6), 637-645.
- Black, D. G., Harte, F. y Davidson, P. M. 2009. *Escherichia coli* thermal inactivation relative to physiological state. *Journal of Food Protection*. 72(2), 399-402.
- Black, E. P., Kelly, A. L. y Fitzgerald, G. F. 2005. The combined effect of high pressure and nisin on inactivation of microorganisms in milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 6(3), 286-292.

- Blackburn, C., Curtis, L., Humpheson, L., Billon, C. y McClure, P. 1997. Development of thermal inactivation models for *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 with temperature, pH and NaCl as controlling factors. *International Journal of Food Microbiology*. 38(1), 31-44.
- Blake, M., Weimer, B., McMahon, D. J. y Savello, P. 1995. Sensory and microbial quality of milk processed for extended shelf life by direct steam injection. *Journal of Food Protection*. 58(9), 1007-1013.
- Blankenship, L. C. 1981. Some characteristics of acid injury and recovery of *Salmonella bareilly* in a model system. *Journal of Food Protection*. 44(1), 73-77.
- Bolton, D., McMahon, C., Doherty, A., Sheridan, J., McDowell, D., Blair, I. y Harrington, D. 2000. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in minced beef under laboratory conditions and in sous-vide prepared minced and solid beef cooked in a commercial retort. *Journal of Applied Microbiology*. 88(4), 626-632.
- Booth, I. y Stratford, M. 2003. Acidulants and low pH. En: *Food Preservatives*, pp. 25-47. Springer.
- Booth, I. R. 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiological Reviews*. 49(4), 359.
- Booth, I. R. y Kroll, R. G. 1989. The preservation of foods by low pH. En: *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures* (Gould, G. W., ed.), pp. 119-160. Elsevier Applied Science: London.
- Bore, E., Langsrud, S., Langsrud, Ø., Rode, T. M. y Holck, A. 2007. Acid-shock responses in *Staphylococcus aureus* investigated by global gene expression analysis. *Microbiology*. 153(7), 2289-2303.
- Bos, M. P., Robert, V. y Tommassen, J. 2007. Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Annual Review of Microbiology*. 61, 191-214.
- Boulos, L., Prevost, M., Barbeau, B., Coallier, J. y Desjardins, R. 1999. LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods*. 37(1), 77-86.
- Bowman, J. P., Bittencourt, C. R. y Ross, T. 2008. Differential gene expression of *Listeria monocytogenes* during high hydrostatic pressure processing. *Microbiology*. 154(2), 462-475.
- Boziaris, I. y Adams, M. 2001. Temperature shock, injury and transient sensitivity to nisin in Gram negatives. *Journal of Applied Microbiology*. 91(4), 715-724.
- Boziaris, I., Humpheson, L. y Adams, M. 1998. Effect of nisin on heat injury and inactivation of *Salmonella enteritidis* PT4. *International Journal of Food Microbiology*. 43(1), 7-13.
- Breeuwer, P. y Abee, T. 2000. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *International Journal of Food Microbiology*. 55(1), 193-200.
- Bromberg, R., George, S. y Peck, M. 1998. Oxygen sensitivity of heated cells of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology*. 85(2), 231-237.
- Brown, J. L., Ross, T., McMeekin, T. A. y Nichols, P. D. 1997. Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance. *International Journal of Food Microbiology*. 37(2), 163-173.
- Brul, S. y Coote, P. 1999. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*. 50(1), 1-17.
- Bruna, D., Voldrich, M., Marek, M. y Kamarád, J. 1997. Effect of high pressure treatment on patulin content in apple concentrate. En: *High pressure research in the biosciences and biotechnology* (Heremans, K., ed.), pp. 335-338. Leuven University Press.
- Butz, P., Funtenberger, S., Haberditzl, T. y Tauscher, B. 1996. High Pressure Inactivation of *Byssoschlamys nivea* Ascospores and Other Heat Resistant Moulds. *LWT-Food Science and Technology*. 29(5-6), 404-410.
- Buzrul, S. y Alpas, H. 2004. Modeling the synergistic effect of high pressure and heat on inactivation kinetics of *Listeria innocua*: a preliminary study. *FEMS Microbiology Letters*. 238(1), 29-36.

BIBLIOGRAFÍA

- Cabiscol, E., Tamarit, J. y Ros, J. 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology*. 3(1), 3-8.
- Camps, D. 2010. *Bioquímica del estrés Oxidativo*. Lulu. com.
- Carmel-Harel, O. y Storz, G. 2000. Roles of the glutathione-and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annual Reviews in Microbiology*. 54(1), 439-461.
- Carmelo, V., Santos, H. y Sá-Correia, I. 1997. Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1325(1), 63-70.
- Casadei, M., Ingram, R., Hitchings, E., Archer, J. y Gaze, J. 2001. Heat resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus delbrueckii* in relation to pH and ethanol. *International Journal of Food Microbiology*. 63(1), 125-134.
- Casadei, M., Mañas, P., Niven, G., Needs, E. y Mackey, B. 2002. Role of membrane fluidity in pressure resistance of *Escherichia coli* NCTC 8164. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(12), 5965-5972.
- Cazemier, A., Wagenaars, S. y Ter Steeg, P. 2001. Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli. *Journal of Applied Microbiology*. 90(5), 761-770.
- 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. y Mañas, P. 2016. Influence of growth and treatment temperature on *Staphylococcus aureus* resistance to pulsed electric fields: Relationship with membrane fluidity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 37, 161-169.
- Cebrián, G., Condón, S. y 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), 107.
- Cebrián, G., Mañas, P. y Condón, S. 2015. Relationship between membrane permeabilization and sensitization of *S. aureus* to sodium chloride upon exposure to Pulsed Electric Fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 32, 91-100.
- Cebrián, G., Michiels, C. W., Mañas, P. y Condón, S. 2010. Biological approach to modeling of *Staphylococcus aureus* high-hydrostatic-pressure inactivation kinetics. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(21), 6982-6990.
- Cebrián, G., Sagarzazu, N., Aertsen, A., Pagán, R., Condón, S. y 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), 187-196.
- Cebrián, G., Sagarzazu, N., Pagán, R., Condón, S. y Mañas, P. 2007. Heat and pulsed electric field resistance of pigmented and non-pigmented enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* in exponential and stationary phase of growth. *International Journal of Food Microbiology*. 118(3), 304-311.
- Cebrián, G., Sagarzazu, N., Pagán, R., Condón, S. y Mañas, P. 2008. Resistance of *Escherichia coli* grown at different temperatures to various environmental stresses. *Journal of Applied Microbiology*. 105(1), 271-278.
- Cerf, O. 1977. A review tailing of survival curves of bacterial spores. *Journal of Applied Microbiology*. 42(1), 1-19.
- Clavero, M. y Beuchat, L. R. 1996. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in broth and processed salami as influenced by pH, water activity, and temperature and suitability of media for its recovery. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(8), 2735-2740.
- Cole, M. B., Davies, K. W., Munro, G., Holyoak, C. D. y Kilsby, D. C. 1993. A vitalistic model to describe the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 12(3), 232-239.

- Coleman, W. H., Chen, D., Li, Y. Q., Cowan, A. E. y Setlow, P. 2007. How moist heat kills spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 189(23), 8458-8466.
- Commoner, B., Townsend, J. y Pake, G. E. 1954. Free radicals in biological materials. *Nature*. 174(4432), 689-691.
- Condón, S., Arrizubieta, M. y Sala, F. 1993. Microbial heat resistance determinations by the multipoint system with the thermoresistometer TR-SC Improvement of this methodology. *Journal of Microbiological Methods*. 18(4), 357-366.
- Condón, S., Bayarte, M. y Sala, F. 1992. Influence of the sporulation temperature upon the heat resistance of *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Microbiology*. 73(3), 251-256.
- Condón, S., Palop, A., Raso, J. y Sala, F. 1996. Influence of the incubation temperature after heat treatment upon the estimated heat resistance values of spores of *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology*. 22(2), 149-152.
- Conesa, R., Andreu, S., Fernández, P., Esnoz, A. y Palop, A. 2009. Nonisothermal heat resistance determinations with the thermoresistometer Mastia. *Journal of Applied Microbiology*. 107(2), 506-513.
- Conner, D. E. y Kotrola, J. S. 1995. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(1), 382-385.
- Coote, P., Jones, M., Seymour, I., Rowe, D., Ferdinando, D., McArthur, A. y Cole, M. 1994. Activity of the plasma membrane H⁺-ATPase is a key physiological determinant of thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 140(8), 1881-1890.
- Corker, H. y Poole, R. K. 2003. Nitric oxide formation by *Escherichia coli* dependence on nitrite reductase, the no-sensing regulator Fnr, and flavohemoglobin Hmp. *Journal of Biological Chemistry*. 278(34), 31584-31592.
- Corradini, M. G., Normand, M. D., Eisenberg, M. y Peleg, M. 2010. Evaluation of a stochastic inactivation model for heat-activated spores of *Bacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(13), 4402-4412.
- Cortezzo, D. y Setlow, P. 2005. Analysis of factors that influence the sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* to DNA damaging chemicals. *Journal of Applied Microbiology*. 98(3), 606-617.
- Coster, H. G. y Zimmermann, U. 1975. The mechanism of electrical breakdown in the membranes of *Valonia utricularis*. *Journal of Membrane Biology*. 22(1), 73-90.
- Costerton, J. W., Ingram, J. M. y Cheng, K. J. 1974. Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria. *Bacteriological Reviews*. 38(1), 87.
- Cotter, P. D. y Hill, C. 2003. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67(3), 429-453.
- Couto, J. A., Neves, F., Campos, F. y Hogg, T. 2005. Thermal inactivation of the wine spoilage yeasts *Dekkera/Brettanomyces*. *International Journal of Food Microbiology*. 104(3), 337-344.
- Cowan, A. E., Olivastro, E. M., Koppel, D. E., Loshon, C. A., Setlow, B. y Setlow, P. 2004. Lipids in the inner membrane of dormant spores of *Bacillus* species are largely immobile. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(20), 7733-7738.
- Crawford, D. R. y Davies, K. 1994. Adaptive response and oxidative stress. *Environmental Health Perspectives*. 102(Suppl 10), 25.
- Crawford, Y. J., Murano, E. A., Olson, D. G. y Shenoy, K. 1996. Use of high hydrostatic pressure and irradiation to eliminate *Clostridium sporogenes* spores in chicken breast. *Journal of Food Protection*. 59(7), 711-715.
- Crowley, J. M. 1973. Electrical breakdown of bimolecular lipid membranes as an electromechanical instability. *Biophysical Journal*. 13(7), 711-724.
- Czechowicz, S. M., Santos, O. y Zottola, E. A. 1996. Recovery of thermally-stressed *Escherichia coli* O157:H7 by media supplemented with pyruvate. *International Journal of Food Microbiology*. 33(2), 275-284.

BIBLIOGRAFÍA

- Chalise, P. R., Perni, S., Shama, G., Novac, B. M., Smith, I. R. y Kong, M. G. 2006. Lethality mechanisms in *Escherichia coli* induced by intense sub-microsecond electrical pulses. *Applied Physics Letters*. 89(15), 153902.
- Chambliss, L. S., Narang, N., Juneja, V. K. y Harrison, M. A. 2006. Thermal injury and recovery of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in ground chicken with temperature, pH, and sodium chloride as controlling factors. *Journal of Food Protection*. 69(9), 2058-2065.
- Chang, D. C., Chassy, B. M., Saunders, J. A. y Sowers, A. E. 2012. *Guide to electroporation and electrofusion*. Elsevier Science, Bulgaria.
- Charoenwong, D., Andrews, S. y Mackey, B. 2011. Role of *rpoS* in the development of cell envelope resilience and pressure resistance in stationary-phase *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(15), 5220-5229.
- Cheftel, J. C. 1992. Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: an overview. En: *High pressure and biotechnology* (Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K., Masson, R., eds.), Vol. 224, pp. 195-209. John Libbery Eurotext Ltd. Montrouge.
- Chen, H. 2007. Use of linear, Weibull, and log-logistic functions to model pressure inactivation of seven foodborne pathogens in milk. *Food Microbiology*. 24(3), 197-204.
- Chen, H. y Hoover, D. G. 2003. Modeling the combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on the inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 4(1), 25-34.
- Chen, H. y Hoover, D. G. 2004. Use of Weibull model to describe and predict pressure inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 5(3), 269-276.
- Cheng, C. M. y Kaspar, C. W. 1998. Growth and processing conditions affecting acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*. 15(2), 157-166.
- Cheng, H. Y., Yang, H. Y. y Chou, C. C. 2002. Influence of acid adaptation on the tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 to some subsequent stresses. *Journal of Food Protection*. 65(2), 260-265.
- Cherepanov, P. P. y Wackernagel, W. 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene*. 158(1), 9-14.
- Cheroutre-Vialette, M., Lebert, I., Hebraud, M., Labadie, J. y Lebert, A. 1998. Effects of pH or a_w stress on growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 42(1), 71-77.
- Cherrington, C., Hinton, M., Mead, G. y Chopra, I. 1991. Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications. *Advances in Microbial Physiology*. 32, 87-108.
- Cherrington, C. A., Hinton, M. y Chopra, I. 1990. Effect of short-chain organic acids on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*. 68(1), 69-74.
- Chhabra, A., Carter, W., Linton, R. y Cousin, M. 2002. A predictive model that evaluates the effect of growth conditions on the thermal resistance of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 78(3), 235-243.
- Chiang, S. M. y Schellhorn, H. E. 2012. Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 525(2), 161-169.
- Chilton, P., Isaacs, N. S., Mackey, B. y Stenning, R. 1997. The effects of high hydrostatic pressure on bacteria. En: *High pressure research in the biosciences and biotechnology* (Heremans, K., ed.), Vol. 229, pp. 225-228. Leuven Univ. Press: Leuven.
- Chilton, P., Isaacs, N. S., Mañas, P. y Mackey, B. M. 2001. Biosynthetic requirements for the repair of membrane damage in pressure-treated *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*. 71(1), 101-104.

- Chiruta, J., Davey, K. y Thomas, C. 1997. Thermal inactivation kinetics of three vegetative bacteria as influenced by combined temperature and pH in a liquid medium. *Food and Bioproducts Processing*. 75(3), 174-180.
- Cho, M., Kim, J., Kim, J. Y., Yoon, J. y Kim, J. H. 2010. Mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by several disinfectants. *Water Research*. 44(11), 3410-3418.
- Chow, K., Mak, N., Wong, M., Zhou, X. y Liang, Y. 2011. Generation of reactive oxygen species and oxidative stress in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by a novel semiconductor catalyst. *Journal of Nanoparticle Research*. 13(3), 1007-1017.
- Chueca, B. 2016. Aproximación molecular al estudio de resistencia de *Escherichia coli* frente a tecnologías de conservación de los alimentos. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Chueca, B., Pagán, R. y García-Gonzalo, D. 2014. Differential mechanism of *Escherichia coli* inactivation by (+)-limonene as a function of cell physiological state and drug's concentration. *PLoS One*. 9(4), e94072.
- Chueca, B., Pagán, R. y García-Gonzalo, D. 2015. Transcriptomic analysis of *Escherichia coli* MG1655 cells exposed to pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 29, 78-86.
- Dahl, J. U., Gray, M. J. y Jakob, U. 2015. Protein quality control under oxidative stress conditions. *Journal of Molecular Biology*. 427(7), 1549-1563.
- Datsenko, K. A. y Wanner, B. L. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(12), 6640-6645.
- Davidson, P. M. y Harrison, M. A. 2002. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technology*. 56(11), 69-78.
- Davidson, P. M., Taylor, T. M. y Schmidt, S. E. 2001. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. En: *Food Microbiology* (Doyle, M. P., Beuchat, L. R., Motville, T. J., eds.), pp. 593-627. ASM Press. Washington DC.
- Davis, M. J., Coote, P. J. y O'Byrne, C. P. 1996. Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: the adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. *Microbiology*. 142(10), 2975-2982.
- De Spiegeleer, P., Sermon, J., Lietaert, A., Aertsen, A. y Michiels, C. 2004. Source of tryptone in growth medium affects oxidative stress resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*. 97(1), 124-133.
- Delcour, A. H. 2009. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 1794(5), 808-816.
- Demple, B. 1991. Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Annual Review of Genetics*. 25(1), 315-337.
- Denich, T. J., Beaudette, L. A., Lee, H. y Trevors, J. T. 2003. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of Microbiological Methods*. 52(2), 149-182.
- Dette, H., Melas, V. B. y Strigul, N. 2005. Design of experiments for microbiological models. En: *Applied Optimal Designs* (Berger, M. P. F., Wong, W.K., eds.), pp. 137-149. Wiley.
- Diez-Gonzalez, F. y Russell, J. 1999. Factors affecting the extreme acid resistance of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*. 16(4), 367-374.
- Dizdaroglu, M. 1992. Measurement of radiation-induced damage to DNA at the molecular level. *International Journal of Radiation Biology*. 61(2), 175-183.
- Doevenspeck, H. 1960. *Verfahren und Vorrichtung zur Gewinnung der einzelnen Phasen aus dispersen Systemen*. Patente N° DE 1237541, Alemania.
- Dogan, C. y Erkmen, O. 2004. High pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation in broth, milk, and peach and orange juices. *Journal of Food Engineering*. 62(1), 47-52.

BIBLIOGRAFÍA

- Dolezalova, E. y Lukes, P. 2015. Membrane damage and active but nonculturable state in liquid cultures of *Escherichia coli* treated with an atmospheric pressure plasma jet. *Bioelectrochemistry*. 103, 7-14.
- Doona, C. J., Feeherry, F. E. y Ross, E. W. 2005. A quasi-chemical model for the growth and death of microorganisms in foods by non-thermal and high-pressure processing. *International Journal of Food Microbiology*. 100(1), 21-32.
- Doyle, M. E. y Mazzotta, A. S. 2000. Review of studies on the thermal resistance of Salmonellae. *Journal of Food Protection*. 63(6), 779-795.
- Doyle, S. M., Shastry, S., Kravats, A. N., Shih, Y. H., Miot, M., Hoskins, J. R., Stan, G. y Wickner, S. 2015. Interplay between *E. coli* DnaK, ClpB and GrpE during protein disaggregation. *Journal of Molecular Biology*. 427(2), 312-327.
- Driks, A. 2002. Proteins of the spore core and coat. En: *Bacillus subtilis and its closest relatives*, pp. 527-535. American Society of Microbiology.
- Dukan, S. y Touati, D. 1996. Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. *Journal of Bacteriology*. 178(21), 6145-6150.
- Dutreux, N., Notermans, S., Wijtzes, T., Góngora-Nieto, M., Barbosa-Cánovas, G. y Swanson, B. 2000. Pulsed electric fields inactivation of attached and free-living *Escherichia coli* and *Listeria innocua* under several conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 54(1), 91-98.
- Earnshaw, R., Appleyard, J. y Hurst, R. 1995. Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. *International Journal of Food Microbiology*. 28(2), 197-219.
- Eklund, T. 1985. The effect of sorbic acid and esters of p-hydroxybenzoic acid on the protonmotive force in *Escherichia coli* membrane vesicles. *Microbiology*. 131(1), 73-76.
- Elfering, S. L., Sarkela, T. M. y Giulivi, C. 2002. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 277(41), 38079-38086.
- Erkmen, O. y Doğan, C. 2004. Kinetic analysis of *Escherichia coli* inactivation by high hydrostatic pressure in broth and foods. *Food Microbiology*. 21(2), 181-185.
- Espina, L., Monfort, S., Álvarez, I., García, D. y Pagán, R. 2014. Combination of pulsed electric fields, mild heat and essential oils as an alternative to the ultrapasteurization of liquid whole egg. *International Journal of Food Microbiology*. 189, 119-125.
- Espina, L., Somolinos, M., Ouazzou, A. A., Condón, S., García, D. y Pagán, R. 2012. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in fruit juices by combined treatments of citrus fruit essential oils and heat. *International Journal of Food Microbiology*. 159(1), 9-16.
- Esteban, M.-D., Aznar, A., Fernández, P. S. y Palop, A. 2013. Combined effect of nisin, carvacrol and a previous thermal treatment on the growth of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella senftenberg*. *Revista de Agaroquímica y Tecnología de Alimentos*. 19(4), 357-364.
- Esterházy, D., King, M. S., Yakovlev, G. y Hirst, J. 2008. Production of reactive oxygen species by complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase) from *Escherichia coli* and comparison to the enzyme from mitochondria. *Biochemistry*. 47(12), 3964-3971.
- Esty, J. y Meyer, K. 1922. The heat resistance of the spores of *B. botulinus* and allied anaerobes. XI. *The Journal of Infectious Diseases*. 31(6), 650-664.
- Evrendilek, G. A. y Zhang, Q. H. 2003. Effects of pH, temperature, and pre-pulsed electric field treatment on pulsed electric field and heat inactivation of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection*. 66(5), 755-759.
- Fahey, R., Brown, W., Adams, W. y Worsham, M. 1978. Occurrence of glutathione in bacteria. *Journal of Bacteriology*. 133(3), 1126-1129.
- Fahey, R. C. 2013. Glutathione analogs in prokaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1830(5), 3182-3198.

- Fakruddin, M., Mazumder, R. M. y Mannan, K. S. B. 2011. Predictive microbiology: modeling microbial responses in food. *Ceylon Journal of Science (Bio. Sci.)*. 40(2), 121-131.
- FAO. 2001. Codex Alimentario. CODEX STAN 221-2001.
- Farber, J. y Levine, R. L. 1986. Sequence of a peptide susceptible to mixed-function oxidation. Probable cation binding site in glutamine synthetase. *Journal of Biological Chemistry*. 261(10), 4574-4578.
- Farber, J. y Pagotto, F. 1992. The effect of acid shock on the heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*. 15(5), 197-201.
- Farkas, D. F. y Hoover, D. G. 2000. High pressure processing. *Journal of Food Science*. 65(s8), 47-64.
- Farr, S. B. y Kogoma, T. 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiological Reviews*. 55(4), 561-585.
- Farr, S. B., Natvig, D. O. y Kogoma, T. 1985. Toxicity and mutagenicity of plumbagin and the induction of a possible new DNA repair pathway in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 164(3), 1309-1316.
- Feeherry, F. E., Munsey, D. T. y Rowley, D. B. 1987. Thermal inactivation and injury of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Applied and Environmental Microbiology*. 53(2), 365-370.
- Ferguson, G. P. y Booth, I. R. 1998. Importance of glutathione for growth and survival of *Escherichia coli* cells: detoxification of methylglyoxal and maintenance of intracellular K⁺. *Journal of Bacteriology*. 180(16), 4314-4318.
- Fernández, A. 2007. Estudio de la adaptación a la acidez como fenómeno capaz de inducir respuestas de tolerancia ácida y protección cruzada frente al calor y los pulsos eléctricos de alto voltaje en *Enterococcus faecium*. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- Fernández, A., Álvarez-Ordóñez, A., López, M. y Bernardo, A. 2009. Effects of organic acids on thermal inactivation of acid and cold stressed *Enterococcus faecium*. *Food Microbiology*. 26(5), 497-503.
- Ferreira, A., Sue, D., O'byrne, C. P. y Boor, K. J. 2003. Role of *Listeria monocytogenes* σ^B in survival of lethal acidic conditions and in the acquired acid tolerance response. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(5), 2692-2698.
- Feyaerts, J., Rogiers, G., Corthouts, J. y Michiels, C. W. 2015. Thiol-reactive natural antimicrobials and high pressure treatment synergistically enhance bacterial inactivation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 27, 26-34.
- Foster, J. W. 1999. When protons attack: microbial strategies of acid adaptation. *Current Opinion in Microbiology*. 2(2), 170-174.
- Foster, J. W. 2000. Microbial responses to acid stress. En: *Bacterial Stress Responses* (Storz, G., Hengge-Aronis, R., eds.), pp. 99-115. ASM Press: Washington.
- Foster, J. W. 2004. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nature Reviews Microbiology*. 2(11), 898-907.
- Fox, R. B. 1984. Prevention of granulocyte-mediated oxidant lung injury in rats by a hydroxyl radical scavenger, dimethylthiourea. *Journal of Clinical Investigation*. 74, 1456-1464.
- Fozo, E. M. y Quivey, R. G. 2004. Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(2), 929-936.
- Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W. y Wood, R. D. 2005. *DNA repair and mutagenesis*. American Society for Microbiology Press.
- Fucci, L., Oliver, C. N., Coon, M. J. y Stadtman, E. R. 1983. Inactivation of key metabolic enzymes by mixed-function oxidation reactions: possible implication in protein turnover and ageing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 80(6), 1521-1525.
- Fung, D. Y. 1992. New developments in rapid method for food microbiology. *Trends in Food Science and Technology*. 3, 142-144.

BIBLIOGRAFÍA

- Gänzle, M. G. y Vogel, R. F. 2001. On-line fluorescence determination of pressure mediated outer membrane damage in *Escherichia coli*. *Systematic and Applied Microbiology*. 24(4), 477-485.
- García, D., Gómez, N., Condón, S., Raso, J. y Pagán, R. 2003. Pulsed electric fields cause sublethal injury in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*. 36(3), 140-144.
- García, D., Gómez, N., Mañas, P., Condón, S., Raso, J. y Pagán, R. 2005a. Occurrence of sublethal injury after pulsed electric fields depending on the micro-organism, the treatment medium pH and the intensity of the treatment investigated. *Journal of Applied Microbiology*. 99(1), 94-104.
- García, D., Gómez, N., Mañas, P., Raso, J. y Pagán, R. 2007. Pulsed electric fields cause bacterial envelopes permeabilization depending on the treatment intensity, the treatment medium pH and the microorganism investigated. *International Journal of Food Microbiology*. 113(2), 219-227.
- García, D., Gómez, N., Raso, J. y Pagán, R. 2005b. Bacterial resistance after pulsed electric fields depending on the treatment medium pH. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 6(4), 388-395.
- García, D., Mañas, P., Gómez, N., Raso, J. y Pagán, R. 2006. Biosynthetic requirements for the repair of sublethal membrane damage in *Escherichia coli* cells after pulsed electric fields. *Journal of Applied Microbiology*. 100(3), 428-435.
- Gayán, E., Govers, S. K. y Aertsen, A. 2017. Impact of high hydrostatic pressure on bacterial proteostasis. *Biophysical Chemistry*. 231, 3-9.
- Geeraerd, A. H., Herremans, C. H. y Van Impe, J. F. 2000. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*. 59(3), 185-209.
- Geeraerd, A. H., Valdramidis, V. P., Devlieghere, F., Bernaert, H., Debevere, J. y Van Impe, J. F. 2004. Development of a novel approach for secondary modelling in predictive microbiology: incorporation of microbiological knowledge in black box polynomial modelling. *International Journal of Food Microbiology*. 91(3), 229-244.
- Geeraerd, A. H., Valdramidis, V. P. y Van Impe, J. F. 2005. GlnaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology*. 102(1), 95-105.
- Genest, P. C., Setlow, B., Melly, E. y Setlow, P. 2002. Killing of spores of *Bacillus subtilis* by peroxyntirite appears to be caused by membrane damage. *Microbiology*. 148(1), 307-314.
- George, S. y Peck, M. 1998. Redox potential affects the measured heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 independently of oxygen concentration. *Letters in Applied Microbiology*. 27(6), 313-317.
- George, S., Richardson, L., Pol, I. y Peck, M. 1998. Effect of oxygen concentration and redox potential on recovery of sublethally heat-damaged cells of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*. 84(5), 903-909.
- Gerhardt, P. 1994. *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology.
- Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P. y Fenn, W. O. 1954. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*. 119(3097), 623-626.
- Gervilla, R., Capellas, M., Ferragut, V. y Guamis, B. 1997. Effect of high hydrostatic pressure on *Listeria innocua* 910 CECT inoculated into ewe's milk. *Journal of Food Protection*. 60(1), 33-37.
- Ghosh, S., Zhang, P., Li, Y.-q. y Setlow, P. 2009. Superdormant spores of *Bacillus* species have elevated wet-heat resistance and temperature requirements for heat activation. *Journal of Bacteriology*. 191(18), 5584-5591.

- Gomberg, M. 1900. An instance of trivalent carbon: triphenylmethy. *Journal of the American Chemical Society*. 22(11), 757-771.
- Gomes, A., Fernandes, E. y Lima, J. L. 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 65(2), 45-80.
- Gómez, N., García, D., Álvarez, I., Condón, S. y Raso, J. 2005a. Modelling inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields in media of different pH. *International Journal of Food Microbiology*. 103(2), 199-206.
- Gómez, N., García, D., Álvarez, I., Raso, J. y Condón, S. 2005b. A model describing the kinetics of inactivation of *Lactobacillus plantarum* in a buffer system of different pH and in orange and apple juice. *Journal of Food Engineering*. 70(1), 7-14.
- Gomez, R., Sinskey, A., Davies, R. y Labuza, T. 1973. Minimal medium recovery of heated *Salmonella typhimurium* LT2. *Microbiology*. 74(2), 267-274.
- González, I., López, M., Mazas, M., Bernardo, A. y Martín, R. 1996. Effect of pH of the recovery medium on the apparent heat resistance of three strains of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*. 31(1-3), 341-347.
- Gossling, B. S. 1960. Artificial mutation of micro-organisms by electrical shock. Patente EE.UU. 2, 955 076.
- Gould, G. 1984. *Injury and repair mechanisms in bacterial spores*. Paper presented at the Society for Applied Bacteriology symposium series.
- Gould, G. 1989. Heat-induced injury and inactivation. En: *Mechanisms of action of food preservation procedures* (Gould, G. W., ed.), pp. 11-42. Elsevier.
- Gould, G. W. 1995. *New methods for food preservation*. Blackie Academic and Professional: Londres.
- Gould, G. W. 2008. Heat sterilization. En: *Russell, Hugo & Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization* (Fraise, A. P., Lambert, P.A., Maillard, J.Y. eds.), pp. 361-383. Wiley.
- Gould, G. W., Brown, M. H. y Fletcher, B. C. 1983. Mechanisms of action of food preservation procedures. En: *Food Microbiology: Advances and Prospects* (Roberts, T. A., Skinner, F.A., eds.), pp. 67-84. Academic Press. Londres.
- Govers, S. K. y Aertsen, A. 2015. Impact of high hydrostatic pressure processing on individual cellular resuscitation times and protein aggregates in *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*. 213, 17-23.
- Govers, S. K., Gayán, E. y Aertsen, A. 2017. Intracellular movement of protein aggregates reveals heterogeneous inactivation and resuscitation dynamics in stressed populations of *Escherichia coli*. *Environmental Microbiology*. 19(2), 511-523.
- Gowrishankar, T. R., Esser, A. T., Vasilkoski, Z., Smith, K. C. y Weaver, J. C. 2006. Microdosimetry for conventional and supra-electroporation in cells with organelles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 341(4), 1266-1276.
- Grahl, T. y Märkl, H. 1996. Killing of microorganisms by pulsed electric fields. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 45(1), 148-157.
- Grant, R., Filman, D., Finkel, S., Kolter, R. y Hogle, J. 1998. The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA. *Nature Structural and Molecular Biology*. 5(4), 294-303.
- Greenacre, E. y Brocklehurst, T. 2006. The acetic acid tolerance response induces cross-protection to salt stress in *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*. 112(1), 62-65.
- Grogan, D. W. y Cronan, J. E. 1997. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 61(4), 429-441.
- Guillén, S. 2017. Inactivación microbiana en especias mediante radiaciones ionizantes. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Zaragoza.
- Gunn, J. S. 2000. Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. *Microbes and Infection*. 2(8), 907-913.

BIBLIOGRAFÍA

- Gusarov, I. y Nudler, E. 2005. NO-mediated cytoprotection: instant adaptation to oxidative stress in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(39), 13855-13860.
- Halder, S., Yadav, K. K., Sarkar, R., Mukherjee, S., Saha, P., Haldar, S., Karmakar, S. y Sen, T. 2015. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. *SpringerPlus*. 4(1), 672.
- Hall, H., Karem, K. y Foster, J. 1995. Molecular responses of microbes to environmental pH stress. *Advances in Microbial Physiology*. 37, 229-272.
- Halliwell, B. 1978. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates. Is it a mechanism for hydroxyl radical production in biochemical systems? *FEBS Letters*. 92(2), 321-321 - 326.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. 2015. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.
- Hansen, N. H. y Riemann, H. 1963. Factors affecting the heat resistance of nonsporing organisms. *Journal of Applied Microbiology*. 26(3), 314-333.
- Harman, D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*. 11(3), 298-300.
- Harold, F. M. y Maloney, P. C. 1996. Energy transduction by ion currents. En: *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology* (Neidhardt, F. C., Curtis III, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, y W. S., R., M., Schaechter, M. y Umberger, H. E., eds.), pp. 283-306. ASM Press: Washington D.C.
- Hartwig, P. y McDaniel, M. 1995. Flavor characteristics of lactic, malic, citric, and acetic acids at various pH levels. *Journal of Food Science*. 60(2), 384-388.
- Hassan, H. M. y Fridovich, I. 1979. Intracellular production of superoxide radical and of hydrogen peroxide by redox active compounds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 196(2), 385-395.
- Hassani, M., Cebrián, G., Mañas, P., Condón, S. y Pagán, R. 2006a. Induced thermotolerance under nonisothermal treatments of a heat sensitive and a resistant strain of *Staphylococcus aureus* in media of different pH. *Letters in Applied Microbiology*. 43(6), 619-624.
- Hassani, M., Condón, S. y Pagán, R. 2007. Predicting microbial heat inactivation under nonisothermal treatments. *Journal of Food Protection*. 70(6), 1457-1467.
- Hassani, M., Mañas, P., Condón, S. y Pagán, R. 2006b. Predicting heat inactivation of *Staphylococcus aureus* under nonisothermal treatments at different pH. *Molecular Nutrition and Food Research*. 50(6), 572-580.
- Hauben, K., Bartlett, D. H., Soontjens, C., Cornelis, K., Wuytack, E. Y. y Michiels, C. W. 1997. *Escherichia coli* mutants resistant to inactivation by high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(3), 945-950.
- Hauben, K., Bernaerts, K. y Michiels, C. 1998. Protective effect of calcium on inactivation of *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure. *Journal of Applied Microbiology*. 85(4), 678-684.
- Hauben, K. J., Wuytack, E. Y., Soontjens, C. C. y Michiels, C. W. 1996. High-pressure transient sensitization of *Escherichia coli* to lysozyme and nisin by disruption of outer-membrane permeability. *Journal of Food Protection*. 59(4), 350-355.
- Hayakawa, I., Kanno, T., Yoshiyama, K. y Fujio, Y. 1994. Oscillatory compared with continuous high pressure sterilization on *Bacillus stearothermophilus* spores. *Journal of Food Science*. 59(1), 164-167.
- Hayashi, K., Morooka, N., Yamamoto, Y., Fujita, K., Isono, K., Choi, S., Ohtsubo, E., Baba, T., Wanner, B. L. y Mori, H. 2006. Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Molecular Systems Biology*. 2(1).
- Hayman, M. M., Anantheswaran, R. C. y Knabel, S. J. 2007. The effects of growth temperature and growth phase on the inactivation of *Listeria monocytogenes* in whole milk subject

- to high pressure processing. *International Journal of Food Microbiology*. 115(2), 220-226.
- He, H., Chang, D. C. y Lee, Y. K. 2007. Using a micro electroporation chip to determine the optimal physical parameters in the uptake of biomolecules in HeLa cells. *Bioelectrochemistry*. 70(2), 363-368.
- Hecker, M., Pané-Farré, J. y Uwe, V. 2007. SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*. 61, 215-236.
- Hecker, M. y Völker, U. 2001. General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Advances in Microbial Physiology*. 44, 35-91.
- Hedén, C. G. y Wyckoff, R. W. 1949. The electron microscopy of heated bacteria. *Journal of Bacteriology*. 58(2), 153.
- Heinz, V., Álvarez, I., Angersbach, A. y Knorr, D. 2001. Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields—basic concepts for process design. *Trends in Food Science and Technology*. 12(3), 103-111.
- Heinz, V. y Knorr, D. 2001. Effects of high pressure on spores. En: *Ultra high pressure treatments of foods*, pp. 77-113. Springer.
- Hengge-Aronis, R. 2000. The general stress response in *Escherichia coli*. En: *Bacterial Stress Response* (Storz, G., Hengge-Aronis, R., eds.). ASM Press. Washington, DC.
- Hickey, E. W. y Hirshfield, I. N. 1990. Low-pH-induced effects on patterns of protein synthesis and on internal pH in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 56(4), 1038-1045.
- Hill, C., Cotter, P. D., Sleator, R. D. y Gahan, C. G. 2002. Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. *International Dairy Journal*. 12(2), 273-283.
- Hiperbaric. High Pressure Processing. <http://www.hiperbaric.com/es/aplicaciones>. 12 Enero de 2018.
- Hite, B. H. 1899. *The effect of pressure in the preservation of milk: a preliminary report* (Vol. 58). West Virginia Agricultural Experiment Station.
- Hodgins, A., Mittal, G. y Griffiths, M. 2002. Pasteurization of fresh orange juice using low-energy pulsed electrical field. *Journal of Food Science*. 67(6), 2294-2299.
- Hood, A., Tuck, A. y Dane, C. 1990. A medium for the isolation, enumeration and rapid presumptive identification of injured *Clostridium perfringens* and *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology*. 69(3), 359-372.
- Horner, K. y Anagnostopoulos, G. 1975. Effect of water activity on heat survival of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* and *Salm. senftenberg*. *Journal of Applied Microbiology*. 38(1), 9-17.
- Hornstra, L. M., de Vries, Y. P., Wells-Bennik, M. H., de Vos, W. M. y Abee, T. 2006. Characterization of germination receptors of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(1), 44-53.
- Hornstra, L. M., Ter Beek, A., Smelt, J. P., Kallemeijn, W. W. y Brul, S. 2009. On the origin of heterogeneity in (preservation) resistance of *Bacillus* spores: Input for a 'systems' analysis approach of bacterial spore outgrowth. *International Journal of Food Microbiology*. 134(1), 9-15.
- Houbraken, J., Samson, R. A. y Frisvad, J. C. 2006. *Byssochlamys*: significance of heat resistance and mycotoxin production. En: *Advances in Food Mycology* (Hocking, A. D., Pitt, J.I., Samon, R.A., Thrane, U. eds.), pp. 211-224. Springer.
- Huang, H. W., Lung, H. M., Yang, B. B. y Wang, C. Y. 2014. Responses of microorganisms to high hydrostatic pressure processing. *Food Control*. 40, 250-259.
- Hülsheger, H. y Niemann, E. G. 1980. Lethal effects of high-voltage pulses on *E. coli* K12. *Radiation and Environmental Biophysics*. 18(4), 281-288.

BIBLIOGRAFÍA

- Hülsheger, H., Potel, J. y Niemann, E. G. 1981. Killing of bacteria with electric pulses of high field strength. *Radiation and Environmental Biophysics*. 20(1), 53-65.
- Hülsheger, H., Potel, J. y Niemann, E. G. 1983. Electric field effects on bacteria and yeast cells. *Radiation and Environmental Biophysics*. 22(2), 149-162.
- Humpheson, L., Adams, M., Anderson, W. y Cole, M. 1998. Biphasic thermal inactivation kinetics in *Salmonella enteritidis* PT4. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(2), 459-464.
- Humphrey, T. 1988. Peroxide sensitivity and catalase activity in *Campylobacter jejuni* after injury and during recovery. *Journal of Applied Microbiology*. 64(4), 337-343.
- Humphries, K. M. y Szveda, L. I. 1998. Selective inactivation of α -ketoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry*. 37(45), 15835-15841.
- Hurst, A. 1984. Revival of vegetative bacteria after sublethal heating. En: *The Revival of Injured Microbes* (Andrew, M. H. E., Russell, A.D. eds.). Academic Press.
- Hurst, A. y Hughes, A. 1978. Stability of ribosomes of *Staphylococcus aureus* S6 sublethally heated in different buffers. *Journal of Bacteriology*. 133(2), 564-568.
- Hwang, I. s., Lee, J., Hwang, J. H., Kim, K. J. y Lee, D. G. 2012. Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals. *The FEBS Journal*. 279(7), 1327-1338.
- Ignatova, M., Leguérinel, I., Guilbot, M., Prévost, H. y Guillou, S. 2008. Modelling the effect of the redox potential and pH of heating media on *Listeria monocytogenes* heat resistance. *Journal of Applied Microbiology*. 105(3), 875-883.
- Imlay, J. A. 2003. Pathways of oxidative damage. *Annual Reviews in Microbiology*. 57(1), 395-418.
- Imlay, J. A. 2013. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nature Reviews. Microbiology*. 11(7), 443.
- Imlay, J. A. 2015. Diagnosing oxidative stress in bacteria: not as easy as you might think. *Current Opinion in Microbiology*. 24, 124-131.
- Imlay, J. A., Chin, S. M. y Linn, S. 1988. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science*. 240(4852), 640-642.
- Imlay, J. A. y Fridovich, I. 1991. Superoxide production by respiring membranes of *Escherichia coli*. *Free Radical Research Communications*. 12(1), 59-66.
- Inaoka, T., Kimura, K., Morimatsu, K. y Yamamoto, K. 2017. Characterization of high hydrostatic pressure-injured *Bacillus subtilis* cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 81(6), 1235-1240.
- Ingram, M., Ottaway, F. y Coppock, J. 1956. The preservative action of acid substances in food. *Chemistry and Industry*. 42, 1154-1162.
- Isaacs, N., Chilton, P. y Mackey, B. 1995. Studies on the inactivation by high pressure of microorganisms. En: *High pressure processing of foods* (Leward, D. A., Johnston, D.E., Earnshaw, R.R., Hating, A.P.M., eds.), pp. 65-79. Nottingham University Press. Nottingham.
- Ishii, A., Oshima, T., Sato, T., Nakasone, K., Mori, H. y Kato, C. 2005. Analysis of hydrostatic pressure effects on transcription in *Escherichia coli* by DNA microarray procedure. *Extremophiles*. 9(1), 65-73.
- Islam, M. S., Inoue, A., Igura, N., Shimoda, M. y Hayakawa, I. 2006. Inactivation of *Bacillus* spores by the combination of moderate heat and low hydrostatic pressure in ketchup and potage. *International Journal of Food Microbiology*. 107(2), 124-130.
- Iwahashi, H., Obuchi, K., Fujii, S. y Komatsu, Y. 1997. Effect of temperature on the role of Hsp104 and trehalose in barotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*. 416(1), 1-5.

- Jacob, H. E., Förster, W. y Berg, H. 1981. Microbiological implications of electric field effects II. Inactivation of yeast cells and repair of their cell envelope. *Journal of Basic Microbiology*. 21(3), 225-233.
- Jaeger, H., Schulz, A., Karapetkov, N. y Knorr, D. 2009. Protective effect of milk constituents and sublethal injuries limiting process effectiveness during PEF inactivation of *Lb. rhamnosus*. *International Journal of Food Microbiology*. 134(1), 154-161.
- Jara, M. 2004. Análisis de la composición del regulón LexA en el dominio Bacteria. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Jay, J. M. 1998. High-temperature food preservation and characteristics of thermophilic microorganisms. En: *Modern food microbiology*, pp. 347-369. Springer.
- Jayaram, S., Castle, G. y Margaritis, A. 1993. The effects of high field DC pulse and liquid medium conductivity on survivability of *Lactobacillus brevis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 40(1), 117-122.
- Johnson, G. A., Ellis, E. A., Kim, H., Muthukrishnan, N., Snavely, T. y Pellois, J. P. 2014. Photoinduced membrane damage of *E. coli* and *S. aureus* by the photosensitizer-antimicrobial peptide conjugate eosin-(KLAKLAK) 2. *PLoS One*. 9(3), e91220.
- Johnson, I. D. 2010. *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 11th Edition*. Life Technologies Corporation.
- Jordan, S., Pascual, C., Bracey, E. y Mackey, B. 2001. Inactivation and injury of pressure-resistant strains of *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. *Journal of Applied Microbiology*. 91(3), 463-469.
- Jørgensen, F., Hansen, T. B. y Knøchel, S. 1999. Heat shock-induced thermotolerance in *Listeria monocytogenes* 13-249 is dependent on growth phase, pH and lactic acid. *Food Microbiology*. 16(2), 185-194.
- Joshi, R., Hu, Q., Schoenbach, K. y Hjalmarsen, H. 2002. Improved energy model for membrane electroporation in biological cells subjected to electrical pulses. *Physical Review E, Statistical, Nonlinear and Soft Matter Physics*. 65(4), 041920.
- Joshi, R. P., Hu, Q. y Schoenbach, K. H. 2004. Modeling studies of cell response to ultrashort, high-intensity electric fields-implications for intracellular manipulation. *IEEE Transactions on Plasma Science*. 32(4), 1677-1686.
- Juneja, V. K. y Marks, H. M. 2003. Mathematical description of non-linear survival curves of *Listeria monocytogenes* as determined in a beef gravy model system at 57.5 to 65 °C. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 4(3), 307-317.
- Kadota, H. 1978. Heat-induced DNA injury in spores and vegetative cells of *Bacillus subtilis*. *Spore*, 27-30.
- Karatzas, K. A. y Bennik, M. H. 2002. Characterization of a *Listeria monocytogenes* Scott A isolate with high tolerance towards high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(7), 3183-3189.
- Karatzas, K. A., Zervos, A., Tassou, C. C., Mallidis, C. G. y Humphrey, T. J. 2007. Piezotolerant small-colony variants with increased thermotolerance, antibiotic susceptibility, and low invasiveness in a clonal *Staphylococcus aureus* population. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(6), 1873-1881.
- Kari, C., Nagy, Z., Kovacs, P. y Hernadi, F. 1971. Mechanism of the growth inhibitory effect of cysteine on *Escherichia coli*. *Microbiology*. 68(3), 349-356.
- Kato, M. y Hayashi, R. 1999. Effects of high pressure on lipids and biomembranes for understanding high-pressure-induced biological phenomena. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 63(8), 1321-1328.
- Katsuki, S., Mjima, T., Nagata, K., Lisitsyn, I., Akiyama, H., Furuta, M., Hayashi, T., Takahashi, K. y Wirkner, S. 2000. Inactivation of *Bacillus Stearothermophilus* by pulsed electric field. *IEEE Transactions on Plasma Science*. 28(1), 155-160.

- Katzin, L. I., Sandholzer, L. A. y Strong, M. E. 1943. Application of the decimal reduction time principle to a study of the resistance of coliform bacteria to pasteurization. *Journal of Bacteriology*. 45(3), 265.
- Kelner, M. J., Bagnell, R. y Welch, K. J. 1990. Thioureas react with superoxide radicals to yield a sulfhydryl compound: explanation for protective effect against paraquat. *Journal of Biological Chemistry*. 265, 1306-1311.
- Kilimann, K., Hartmann, C., Vogel, R. y Gänzle, M. 2005. Differential inactivation of glucose-and glutamate dependent acid resistance of *Escherichia coli* TMW 2.497 by high-pressure treatments. *Systematic and Applied Microbiology*. 28(8), 663-671.
- Kim, B. H., Kim, S., Kim, H. G., Lee, J., Lee, I. S. y Park, Y. K. 2005. The formation of cyclopropane fatty acids in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*. 151(1), 209-218.
- Kim, H. y Silva, F. 2016. Modeling the inactivation of *Neosartorya fischeri* ascospores in apple juice by high pressure, power ultrasound and thermal processing. *Food Control*. 59, 530-537.
- Kim, S. H., Gorski, L., Reynolds, J., Orozco, E., Fielding, S., Park, Y. H. y Borucki, M. K. 2006. Role of *uvrA* in the growth and survival of *Listeria monocytogenes* under UV radiation and acid and bile stress. *Journal of Food Protection*. 69(12), 3031-3036.
- Kimura, K., Morimatsu, K., Inaoka, T. y Yamamoto, K. 2017. Injury and recovery of *Escherichia coli* ATCC25922 cells treated by high hydrostatic pressure at 400–600 MPa. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 123(6), 698-706.
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., Tarchini, R., Peters, S. A., Sandbrink, H. M. y Fiers, M. W. 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100(4), 1990-1995.
- Klotz, B., Mañas, P. y Mackey, B. M. 2010. The relationship between membrane damage, release of protein and loss of viability in *Escherichia coli* exposed to high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*. 137(2), 214-220.
- Kobayashi, H. 1985. A proton-translocating ATPase regulates pH of the bacterial cytoplasm. *Journal of Biological Chemistry*. 260(1), 72-76.
- Kobayashi, K., Ehrlich, S. D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K., Arnaud, M., Asai, K., Ashikaga, S., Aymerich, S. y Bessieres, P. 2003. Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100(8), 4678-4683.
- Korolczuk, J., Mc Keag, J. R., Fernandez, J. C., Baron, F., Grosset, N. y Jeantet, R. 2006. Effect of pulsed electric field processing parameters on *Salmonella enteritidis* inactivation. *Journal of Food Engineering*. 75(1), 11-20.
- Koseki, S. y Yamamoto, K. 2006. pH and solute concentration of suspension media affect the outcome of high hydrostatic pressure treatment of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 111(2), 175-179.
- Koutsoumanis, K. y Sofos, J. 2004. Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* after habituation at different pH conditions. *Letters in Applied Microbiology*. 38(4), 321-326.
- Krassowska, W. y Filev, P. D. 2007. Modeling electroporation in a single cell. *Biophysical Journal*. 92(2), 404-417.
- Krishna, C. M., Liebmann, J. E., Kaufman, D., DeGraff, W., Hahn, S. M., McMurry, T., Mitchell, J. B. y Russo, A. 1992. The catecholic metal sequestering agent 1, 2-dihydroxybenzene-3, 5-disulfonate confers protection against oxidative cell damage. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 294(1), 98-106.
- Kurahashi, M., Katsura, S. y Mizuno, A. 1997. Radical formation due to discharge inside bubble in liquid. *Journal of Electrostatics*. 42(1-2), 93-105.
- Lado, B. H. y Yousef, A. E. 2003. Selection and identification of a *Listeria monocytogenes* target strain for pulsed electric field process optimization. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(4), 2223-2229.

- Laing, L. G., Gluick, T. C. y Draper, D. E. 1994. Stabilization of RNA structure by Mg ions: specific and non-specific effects. *Journal of Molecular Biology*. 237(5), 577-587.
- Lang, K. S., Hall, A. N., Merrikh, C. N., Ragheb, M., Tabakh, H., Pollock, A. J., Woodward, J. J., Dreifus, J. E. y Merrikh, H. 2017. Replication-transcription conflicts generate R-loops that orchestrate bacterial stress survival and pathogenesis. *Cell*. 170(4), 787-799.e718.
- Lederberg, J. 1950. The beta-d-galactosidase of *Escherichia coli*, strain K-12. *Journal of Bacteriology*. 60(4), 381.
- Leenanon, B. y Drake, M. 2001. Acid stress, starvation, and cold stress affect poststress behavior of *Escherichia coli* O157:H7 and nonpathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*. 64(7), 970-974.
- Legan, J., Stewart, C. y Cole, M. 2009. Modeling the growth, survival and death of microbial pathogens in foods. En: *Foodborne Pathogens (Second Edition)* (Blackburn, C. W., McClure, P.J. eds.), pp. 66-112. Elsevier.
- Leighton, T. y Doi, R. H. 1971. The stability of messenger ribonucleic acid during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*. 246(10), 3189-3195.
- Leistner, L. 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*. 55(1), 181-186.
- Lemire, J. A., Harrison, J. J. y Turner, R. J. 2013. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews. Microbiology*. 11(6), 371.
- Leuschner, R. G. y Lillford, P. J. 2003. Thermal properties of bacterial spores and biopolymers. *International Journal of Food Microbiology*. 80(2), 131-143.
- Leyer, G. J. y Johnson, E. A. 1992. Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp. in cheese. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(6), 2075-2080.
- Leyer, G. J., Wang, L.-L. y Johnson, E. A. 1995. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(10), 3752-3755.
- Li, J., Suo, Y., Liao, X., Ahn, J., Liu, D., Chen, S., Ye, X. y Ding, T. 2017. Analysis of *Staphylococcus aureus* cell viability, sublethal injury and death induced by synergistic combination of ultrasound and mild heat. *Ultrasonics Sonochemistry*. 39, 101-110.
- Liang, Z., Cheng, Z. y Mittal, G. 2006. Inactivation of spoilage microorganisms in apple cider using a continuous flow pulsed electric field system. *LWT-Food Science and Technology*. 39(4), 351-357.
- Lianou, A. y Koutsoumanis, K. P. 2013. Evaluation of the strain variability of *Salmonella enterica* acid and heat resistance. *Food Microbiology*. 34(2), 259-267.
- Lianou, A., Stopforth, J. D., Yoon, Y., Wiedmann, M. y Sofos, J. N. 2006. Growth and stress resistance variation in culture broth among *Listeria monocytogenes* strains of various serotypes and origins. *Journal of Food Protection*. 69(11), 2640-2647.
- Lindahl, T. y Nyberg, B. 1972. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*. 11(19), 3610-3618.
- López-Pedemonte, T., Brinéz, W., Roig-Sagués, A. y Guamis, B. 2006. Fate of *Staphylococcus aureus* in cheese treated by ultrahigh pressure homogenization and high hydrostatic pressure. *Journal of Dairy Science*. 89(12), 4536-4544.
- López-Pedemonte, T., Roig-Sagués, A. X., De Lamo, S., Gervilla, R. y Guamis, B. 2007. High hydrostatic pressure treatment applied to model cheeses made from cow's milk inoculated with *Staphylococcus aureus*. *Food Control*. 18(5), 441-447.
- Lou, Y. y Yousef, A. E. 1996. Resistance of *Listeria monocytogenes* to heat after adaptation to environmental stresses. *Journal of Food Protection*. 59(5), 465-471.
- Lou, Y. y Yousef, A. E. 1997. Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(4), 1252-1255.

BIBLIOGRAFÍA

- Ludwig, H. y Schreck, C. 1997. The inactivation of vegetative bacteria by pressure. En: *High pressure research in the biosciences and biotechnology* (Herremans, K., ed.), pp. 221-224. Leuven University Press: Leuven.
- Lushchak, V. I. 2011. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*. 153(2), 175-190.
- Lushchak, V. I. 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*. 224, 164-175.
- Luu, S., Cruz-Mora, J., Setlow, B., Feeherry, F. E., Doona, C. J. y Setlow, P. 2015. The effects of heat activation on *Bacillus* spore germination, with nutrients or under high pressure, with or without various germination proteins. *Applied and Environmental Microbiology*. 81(8), 2927-2938.
- Mackey, B. 1983. Changes in antibiotic sensitivity and cell surface hydrophobicity in *Escherichia coli* injured by heating, freezing, drying or gamma radiation. *FEMS Microbiology Letters*. 20(3), 395-399.
- Mackey, B. 2000. Injured bacteria. En: *The Microbiological Safety and Quality of Food Vol. I* (Lund, M., Baird-Parker, T. C., Gould, G. W.), pp. 315-341. Springer.
- Mackey, B., Boogard, E., Hayes, C. y Baranyi, J. 1994. Recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 22(4), 227-237.
- Mackey, B., Forestiere, K. y Isaacs, N. 1995. Factors affecting the resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure. *Food Biotechnology*. 9(1-2), 1-11.
- Mackey, B., Miles, C., Parsons, S. y Seymour, D. 1991. Thermal denaturation of whole cells and cell components of *Escherichia coli* examined by differential scanning calorimetry. *Microbiology*. 137(10), 2361-2374.
- Mackey, B. M. y Mañas, P. 2008. Inactivation of *Escherichia coli* by high pressure. En: *High-pressure microbiology*, pp. 53-85. American Society of Microbiology.
- Mackey, B. M. y Seymour, D. A. 1987. The effect of catalase on recovery of heat-injured DNA-repair mutants of *Escherichia coli*. *Microbiology*. 133(6), 1601-1610.
- Madigan, M. T. B., Martinko, T. D., Dunlap, J. M., Clark, P. V. y Madigan, D. P. M. T. 2009. *Brock: Biología de los microorganismos*.
- Madshus, I. H. 1988. Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. *Biochemical Journal*. 250(1), 1.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S. y Leguérinel, I. 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*. 72(1), 107-113.
- Maleki, F., Khosravi, A., Nasser, A., Taghinejad, H. y Azizian, M. 2016. Bacterial Heat Shock Protein Activity. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 10(3), BE01-BE03.
- Malone, A. S., Chung, Y.-K. y Yousef, A. E. 2006. Genes of *Escherichia coli* O157:H7 that are involved in high-pressure resistance. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(4), 2661-2671.
- Mañas, P. 1999. Higienización del huevo líquido por ultrasonidos y calor. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Mañas, P. y Mackey, B. M. 2004. Morphological and physiological changes induced by high hydrostatic pressure in exponential-and stationary-phase cells of *Escherichia coli*: relationship with cell death. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(3), 1545-1554.
- Mañas, P. y Pagán, R. 2005. Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology*. 98(6), 1387-1399.
- Mañas, P., Pagán, R., Leguérinel, I., Condón, S., Mafart, P. y Sala, F. 2001. Effect of sodium chloride concentration on the heat resistance and recovery of *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*. 63(3), 209-216.

- Mañas, P., Pagán, R., Raso, J. y Condón, S. 2003. Predicting thermal inactivation in media of different pH of *Salmonella* grown at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology*. 87(1), 45-53.
- Marcén, M. 2014. Estudio del estrés oxidativo en bacterias. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Zaragoza.
- Marcén, M., Ruiz, V., Serrano, M. J., Condón, S. y Mañas, P. 2017. Oxidative stress in *E. coli* cells upon exposure to heat treatments. *International Journal of Food Microbiology*. 241, 198-205.
- Margalef-Català, M., Araque, I., Weidmann, S., Guzzo, J., Bordons, A. y Reguant, C. 2016. Protective role of glutathione addition against wine-related stress in *Oenococcus oeni*. *Food Research International*. 90, 8-15.
- Margosch, D., Moravek, M., Gänzle, M. G., Märtlbauer, E., Vogel, R. F. y Ehrmann, M. A. 2005. Effect of high pressure and heat on bacterial toxins. *Food Technology and Biotechnology*. 43(3), 211-217.
- Marietou, A., Nguyen, A. T., Allen, E. E. y Bartlett, D. H. 2015. Adaptive laboratory evolution of *Escherichia coli* K-12 MG1655 for growth at high hydrostatic pressure. *Frontiers in Microbiology*. 5, 749.
- Marquis, R. E. y Bender, G. R. 1987. Barophysiology of prokaryotes and proton-translocating ATPases. En: *Current perspectives in high pressure biology* (Jannasch, H. W., Marquis, R.E., Zimmerman, A.M., eds.), pp. 65-73. Academic Press.
- Martín-Belloso, O. y Sobrino-López, A. 2011. Combination of pulsed electric fields with other preservation techniques. *Food and Bioprocess Technology*. 4(6), 954-968.
- Martinez, A. y Kolter, R. 1997. Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *Journal of Bacteriology*. 179(16), 5188-5194.
- Martínez, S. 2002. Estudio de la influencia de los factores ambientales sobre la resistencia al calor de *Enterococcus faecium*: un microorganismo indicador de la calidad de los alimentos "sous vide". Tesis doctoral. Universidad de León.
- Martínez, S., López, M. y Bernardo, A. 2003. Thermal inactivation of *Enterococcus faecium*: effect of growth temperature and physiological state of microbial cells. *Letters in Applied Microbiology*. 37(6), 475-481.
- Masip, L., Veeravalli, K. y Georgiou, G. 2006. The many faces of glutathione in bacteria. *Antioxidants and Redox Signaling*. 8(5-6), 753-762.
- Masson, F., Lebert, A., Talon, R. y Montel, M. 1997. Effects of physico-chemical factors influencing tyramine production by *Carnobacterium divergens*. *Journal of Applied Microbiology*. 83(1), 36-42.
- Mattick, K., Jørgensen, F., Legan, J., Lappin-Scott, H. y Humphrey, T. 2001. Improving recovery of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 cells injured by heating at different water activity values. *Journal of Food Protection*. 64(10), 1472-1476.
- Mazas, M., López, M., González, I., González, J., Bernardo, A. y Martín, R. 1998. Effects of the heating medium pH on heat resistance of *Bacillus cereus* spores. *Journal of Food Safety*. 18(1), 25-36.
- Mazzotta, A. S. 2001. Thermal inactivation of stationary-phase and acid-adapted *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. *Journal of Food Protection*. 64(3), 315-320.
- McClements, J., Patterson, M. y Linton, M. 2001. The effect of growth stage and growth temperature on high hydrostatic pressure inactivation of some psychrotrophic bacteria in milk. *Journal of Food Protection*. 64(4), 514-522.
- McCord, J. M. y Fridovich, I. 1969. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *Journal of Biological Chemistry*. 244(22), 6056-6063.
- McKenney, P. T., Driks, A. y Eichenberger, P. 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology*. 11(1), 33-44.

BIBLIOGRAFÍA

- McMahon, C., Byrne, C., Sheridan, J., McDowell, D., Blair, I. y Hegarty, T. 2000. The effect of culture growth phase on induction of the heat shock response in *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*. 89(2), 198-206.
- McMeekin, T. A., Olley, J. y Ross, T. 1993. *Predictive microbiology: theory and application*. Research Studies Press Ltd., John Wiley & Sons, New York.
- Metselaar, K. I., Abee, T., Zwietering, M. H. y den Besten, H. M. 2016. Modeling and validation of the ecological behavior of wild-type *Listeria monocytogenes* and stress-resistant variants. *Applied and Environmental Microbiology*. 82(17), 5389-5401.
- Michiels, C. W., Peeters, K., Soontjens, C., Wuytack, E. y Hauben, K. 1996. Baroprotective effect of low concentration of Na⁺ and Li⁺ on a *Rhodotorula rubra* strain. En: *High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology* (Heremans, K., ed.). Leuven University Press: Leuven.
- Mielecki, D., Wrzesiński, M. y Grzesiuk, E. 2015. Inducible repair of alkylated DNA in microorganisms. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 763, 294-305.
- Miles, C. A. 2006. Relating cell killing to inactivation of critical components. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(1), 914-917.
- Miller, F. A., Gil, M. M., Brandão, T. R., Teixeira, P. y Silva, C. L. 2009. Sigmoidal thermal inactivation kinetics of *Listeria innocua* in broth: influence of strain and growth phase. *Food Control*. 20(12), 1151-1157.
- Min, S. y Zhang, Q. 2000. Effect of water activity on the inactivation of *Enterobacter cloacae* by pulsed electric field treatment. En: *IFT Annual Meeting*. Dallas, EE.UU.
- Moats, W., Dabbah, R. y Edwards, V. 1971a. Survival of *Salmonella anatum* heated in various media. *Applied Microbiology*. 21(3), 476-481.
- Moats, W., Dabrah, R. y Edwards, V. 1971b. Interpretation of nonlogarithmic survivor curves of heated bacteria. *Journal of Food Science*. 36(3), 523-526.
- Mogk, A., Deuerling, E., Vorderwülbecke, S., Vierling, E. y Bukau, B. 2003. Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. *Molecular Microbiology*. 50(2), 585-595.
- Mogk, A., Tomoyasu, T., Goloubinoff, P., Rüdiger, S., Röder, D., Langen, H. y Bukau, B. 1999. Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *The EMBO Journal*. 18(24), 6934-6949.
- Moir, A. 2006. How do spores germinate? *Journal of Applied Microbiology*. 101(3), 526-530.
- Molina-Höppner, A. 2002. Physiological response of *Lactococcus lactis* to high-pressure. Tesis Doctoral. Universidad Técnica de Múnich.
- Molina-Höppner, A., Doster, W., Vogel, R. F. y Gänzle, M. G. 2004. Protective effect of sucrose and sodium chloride for *Lactococcus lactis* during sublethal and lethal high-pressure treatments. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(4), 2013-2020.
- Mols, M., Ceragioli, M. y Abee, T. 2011. Heat stress leads to superoxide formation in *Bacillus cereus* detected using the fluorescent probe MitoSOX. *International Journal of Food Microbiology*. 151(1), 119-122.
- Mols, M., Pier, I., Zwietering, M. H. y Abee, T. 2009. The impact of oxygen availability on stress survival and radical formation of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*. 135(3), 303-311.
- Mols, M., Van Kranenburg, R., Van Melis, C. C., Moezelaar, R. y Abee, T. 2010. Analysis of acid-stressed *Bacillus cereus* reveals a major oxidative response and inactivation-associated radical formation. *Environmental Microbiology*. 12(4), 873-885.
- Monfort, S., Gayán, E., Saldaña, G., Puértolas, E., Condón, S., Raso, J. y Álvarez, I. 2010. Inactivation of *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus* by pulsed electric fields in liquid whole egg. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 11(2), 306-313.
- Montanari, C., Serrazanetti, D. I., Felis, G., Torriani, S., Tabanelli, G., Lanciotti, R. y Gardini, F. 2015. New insights in thermal resistance of staphylococcal strains belonging to the

- species *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*. 50, 605-612.
- Moody, A., Marx, G., Swanson, B. G. y Bermúdez-Aguirre, D. 2014. A comprehensive study on the inactivation of *Escherichia coli* under nonthermal technologies: High hydrostatic pressure, pulsed electric fields and ultrasound. *Food Control*. 37, 305-314.
- Morikawa, K., Ohniwa, R. L., Kim, J., Maruyama, A., Ohta, T. y Takeyasu, K. 2006. Bacterial nucleoid dynamics: oxidative stress response in *Staphylococcus aureus*. *Genes to Cells*. 11(4), 409-423.
- Moriyama, R., Fukuoka, H., Miyata, S., Kudoh, S., Hattori, A., Kozuka, S., Yasuda, Y., Tochikubo, K. y Makino, S. 1999. Expression of a germination-specific amidase, SleB, of Bacilli in the forespore compartment of sporulating cells and its localization on the exterior side of the cortex in dormant spores. *Journal of Bacteriology*. 181(8), 2373-2378.
- Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R. M. y Martín-Belloso, O. 2007. Influence of treatment time and pulse frequency on *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* populations inoculated in melon and watermelon juices treated by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology*. 117(2), 192-200.
- Nakayama, A., Yano, Y., Kobayashi, S., Ishikawa, M. y Sakai, K. 1996. Comparison of pressure resistances of spores of six *Bacillus* strains with their heat resistances. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(10), 3897-3900.
- Neal, A., Weinstock, J. O. y Lampen, J. O. 1965. Mechanisms of fatty acid toxicity for yeast. *Journal of Bacteriology*. 90(1), 126-131.
- Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L. y Schaechter, M. 1990. The effects of temperature, pressure and pH. En: *Physiology of the bacterial cell. A molecular approach* (Neidhardt, F. C., Ingraham, J.L., Schaechter, M., eds.), pp. 226-246. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts, Estados Unidos.
- Neumann, E. y Rosenheck, K. 1972. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *Journal of Membrane Biology*. 10(1), 279-290.
- Ng, H. 1982. Development of high heat resistance of *Arizona* neotype by preincubation at 35 degrees C in media containing NaCl. *Applied and Environmental Microbiology*. 43(6), 1294-1299.
- Ng, H., Bayne, H. G. y Garibaldi, J. A. 1969. Heat resistance of *Salmonella*: the uniqueness of *Salmonella senftenberg* 775W. *Applied Microbiology*. 17(1), 78-82.
- Nguyen, H. T., Corry, J. E. y Miles, C. A. 2006. Heat resistance and mechanism of heat inactivation in thermophilic campylobacters. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(1), 908-913.
- Niven, G. W., Miles, C. A. y Mackey, B. M. 1999. The effects of hydrostatic pressure on ribosome conformation in *Escherichia coli*: an in vivo study using differential scanning calorimetry. *Microbiology*. 145(2), 419-425.
- Nixon, P. 1971. *Temperature integration as a means of assessing storage conditions*. Paper presented at the Report on Quality in Fish Products, Seminar.
- Noma, S. y Hayakawa, I. 2003. Barotolerance of *Staphylococcus aureus* is increased by incubation at below 0 °C prior to hydrostatic pressure treatment. *International Journal of Food Microbiology*. 80(3), 261-264.
- Nonaka, G., Blankschien, M., Herman, C., Gross, C. A. y Rhodius, V. A. 2006. Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor, σ^{32} , reveals a multifaceted cellular response to heat stress. *Genes and Development*. 20(13), 1776-1789.
- Noriega, E., Velliou, E., Van Derlinden, E., Mertens, L. y Van Impe, J. F. 2013. Effect of cell immobilization on heat-induced sublethal injury of *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* and *Listeria innocua*. *Food Microbiology*. 36(2), 355-364.

BIBLIOGRAFÍA

- O'Reilly, C. E., O'Connor, P. M., Kelly, A. L., Beresford, T. P. y Murphy, P. M. 2000. Use of hydrostatic pressure for inactivation of microbial contaminants in cheese. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(11), 4890-4896.
- O'Sullivan, E. y Condon, S. 1999. Relationship between acid tolerance, cytoplasmic pH, and ATP and H⁺-ATPase levels in chemostat cultures of *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(6), 2287-2293.
- Ohshima, T., Okuyama, K. y Sato, M. 2002. Effect of culture temperature on high-voltage pulse sterilization of *Escherichia coli*. *Journal of Electrostatics*. 55(3), 227-235.
- Ohtsu, I., Wiriyanawudhiwong, N., Morigasaki, S., Nakatani, T., Kadokura, H. y Takagi, H. 2010. The L-cysteine/L-cystine shuttle system provides reducing equivalents to the periplasm in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 285(23), 17479-17487.
- Oxen, P. y Knorr, D. 1993. Baroprotective effects of high solute concentrations against inactivation of *Rhodotorula rubra*. *LWT-Food Science and Technology*. 26(3), 220-223.
- Pace, B. y Campbell, L. L. 1967. Correlation of maximal growth temperature and ribosome heat stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 57(4), 1110-1116.
- Pagán, R. 1997. Resistencia frente al calor y los ultrasonidos bajo presión de *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica* y *Listeria monocytogenes*. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Pagán, R., Condón, S. y Raso, J. 2005. Microbial inactivation by pulsed electric fields. En: *Novel Food Processing Technologies* (Barbosa-Cánovas, G. V., Tapia, M.S., Cano, P., eds.), pp. 45-68. Marcel Dekker/CRC Press, Nueva York, Estados Unidos.
- Pagán, R., Condón, S. y Sala, F. 1997. Effects of several factors on the heat-shock-induced thermotolerance of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(8), 3225-3232.
- Pagán, R., Esplugas, S., Góngora-Nieto, M., Barbosa-Cánovas, G. y Swanson, B. 1998. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores using high intensity pulsed electric fields in combination with other food conservation technologies. *Food Science and Technology International*. 4(1), 33-44.
- Pagán, R., Jordan, S., Benito, A. y Mackey, B. 2001. Enhanced acid sensitivity of pressure-damaged *Escherichia coli* O157 cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(4), 1983-1985.
- Pagán, R. y Mackey, B. 2000. Relationship between membrane damage and cell death in pressure-treated *Escherichia coli* cells: differences between exponential-and stationary-phase cells and variation among strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(7), 2829-2834.
- Pagán, R. y Mañas, P. 2006. Fundamental aspects of microbial membrane electroporation. En: *Pulsed electric fields technology for the food industry*, pp. 73-94. Springer.
- Pagán, R., Mañas, P., Raso, J. y Sala, F. J. 1999. Heat resistance of *Yersinia enterocolitica* grown at different temperatures and heated in different media. *International Journal of Food Microbiology*. 47(1), 59-66.
- Paidhungat, M., Ragkousi, K. y Setlow, P. 2001. Genetic requirements for induction of germination of spores of *Bacillus subtilis* by Ca²⁺-dipicolinate. *Journal of Bacteriology*. 183(16), 4886-4893.
- 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(9), 2513-2519.
- Pakhomova, O. N., Khorokhorina, V. A., Bowman, A. M., Rodaitė-Riševičienė, R., Saulis, G., Xiao, S. y Pakhomov, A. G. 2012. Oxidative effects of nanosecond pulsed electric field exposure in cells and cell-free media. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 527(1), 55-64.
- Palhano, F. L., Orlando, M. T. y Fernandes, P. M. 2004. Induction of baroresistance by hydrogen peroxide, ethanol and cold-shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*. 233(1), 139-145.

- Palop, A. 1995. Estudio de la influencia de diversos factores ambientales sobre la temperatura de *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* y *B. coagulans*. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Palop, A., Álvarez, I., Raso, J. y Condón, S. 2000. Heat resistance of *Alicyclobacillus acidocaldarius* in water, various buffers, and orange juice. *Journal of Food Protection*. 63(10), 1377-1380.
- Palop, A., Raso, J., Pagán, R., Condón, S. y Sala, F. 1996. Influence of pH on heat resistance of *Bacillus licheniformis* in buffer and homogenised foods. *International Journal of Food Microbiology*. 29(1), 1-10.
- Palou, E., López-Malo, A., Barbosa-Cánovas, G., Welte-Chanes, J. y Swanson, B. 1997. Kinetic analysis of *Zygosaccharomyces bailii* inactivation by high hydrostatic pressure. *LWT-Food Science and Technology*. 30(7), 703-708.
- Palou, E., López-Malo, A., Barbosa-Cánovas, G., Welte-Chanes, J., Davidson, P. y Swanson, B. 1998. Effect of oscillatory high hydrostatic pressure treatments on *Byssoschlamys nivea* ascospores suspended in fruit juice concentrates. *Letters in Applied Microbiology*. 27(6), 375-378.
- Panagou, E. Z., Katsaboukakis, C. Z. y Nychas, G. J. E. 2002. Heat resistance of *Monascus ruber* ascospores isolated from thermally processed green olives of the Conservolea variety. *International Journal of Food Microbiology*. 76(1), 11-18.
- Paredes-Sabja, D., Setlow, P. y Sarker, M. R. 2011. Germination of spores of Bacillales and Clostridiales species: mechanisms and proteins involved. *Trends in Microbiology*. 19(2), 85-94.
- Park, S. y Imlay, J. A. 2003. High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the fenton reaction. *Journal of Bacteriology*. 185(6), 1942-1950.
- Park, S., You, X. y Imlay, J. A. 2005. Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx-mutants of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(26), 9317-9322.
- Patsoukis, N., Papapostolou, I. y Georgiou, C. D. 2005. Interference of non-specific peroxidases in the fluorescence detection of superoxide radical by hydroethidine oxidation: a new assay for H₂O₂. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 381(5), 1065-1072.
- Patterson, M. 2005. Microbiology of pressure-treated foods. *Journal of Applied Microbiology*. 98(6), 1400-1409.
- Patterson, M. F., Quinn, M., Simpson, R. y Gilmour, A. 1995. Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods. *Journal of Food Protection*. 58(5), 524-529.
- Paula, S., Volkov, A., Van Hoek, A., Haines, T. y Deamer, D. W. 1996. Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness. *Biophysical Journal*. 70(1), 339-348.
- Peleg, M. 2006. *Advanced quantitative microbiology for foods and biosystems: models for predicting growth and inactivation*. CRC Press.
- Peleg, M. y Cole, M. B. 1998. Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science*. 38(5), 353-380.
- Peleg, M. y Penchina, C. M. 2000. Modeling microbial survival during exposure to a lethal agent with varying intensity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 40(2), 159-172.
- Pellon, J. R. y Sinskey, A. J. 1984. *Heat-induced damage to the bacterial chromosome and its repair*. Paper presented at the Society for Applied Bacteriology symposium series.
- Peña-Meléndez, M., Perry, J. J. y Yousef, A. E. 2014. Changes in thermal resistance of three *Salmonella* serovars in response to osmotic shock and adaptation at water activities reduced by different humectants. *Journal of Food Protection*. 77(6), 914-918.
- Perrier-Cornet, J. M., Hayert, M. y Gervais, P. 1999. Yeast cell mortality related to a high-pressure shift: occurrence of cell membrane permeabilization. *Journal of Applied Microbiology*. 87(1), 1-7.

BIBLIOGRAFÍA

- Phan-Thanh, L., Mahouin, F. y Aligé, S. 2000. Acid responses of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 55(1), 121-126.
- Piggot, P. J. y Hilbert, D. W. 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current opinion in microbiology*. 7(6), 579-586.
- Pisoschi, A. M. y Pop, A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 97, 55-74.
- Plopper, G. 2012. *Principles of Cell Biology*. Jones and Bartlett Learning, LLC.
- Pophaly, S. D., Singh, R., Pophaly, S. D., Kaushik, J. K. y Tomar, S. K. 2012. Current status and emerging role of glutathione in food grade lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*. 11(1), 114.
- Possas, A., Pérez-Rodríguez, F., Valero, A. y García-Gimeno, R. M. 2017. Modelling the inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure processing in foods: A review. *Trends in Food Science and Technology*. 70, 45-55.
- Presser, K., Ratkowsky, D. y Ross, T. 1997. Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(6), 2355-2360.
- Prinz, W. A., Åslund, F., Holmgren, A. y Beckwith, J. 1997. The Role of the Thioredoxin and Glutaredoxin Pathways in Reducing Protein Disulfide Bonds in the *Escherichia coli* Cytoplasm. *Journal of Biological Chemistry*. 272(25), 15661-15667.
- Pruitt, K. M. y Kamau, D. N. 1993. Mathematical models of bacterial growth, inhibition and death under combined stress conditions. *Journal of Industrial Microbiology*. 12(3-5), 221-231.
- Puértolas, E., López, N., Condón, S., Raso, J. y Álvarez, I. 2009. Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 130(1), 49-55.
- Purushothaman, S., Cicutta, P., Ces, O. y Brooks, N. J. 2015. Influence of high pressure on the bending rigidity of model membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*. 119(30), 9805-9810.
- Qin, B. L., Barbosa-Cánovas, G. V., Swanson, B. G., Pedrow, P. D. y Olsen, R. G. 1995. A continuous treatment system for inactivating microorganisms with pulsed electric fields. Paper presented at the Industry Applications Conference, 1995. Thirtieth IAS Annual Meeting, IAS'95., Conference Record of the 1995 IEEE.
- Qin, B. L., Barbosa-Cánovas, G. V., Swanson, B. G., Pedrow, P. D. y Olsen, R. G. 1998. Inactivating microorganisms using a pulsed electric field continuous treatment system. *IEEE Transactions on Industry Applications*. 34(1), 43-50.
- Quivey, R. G., Faustoferri, R., Monahan, K. y Marquis, R. 2000. Shifts in membrane fatty acid profiles associated with acid adaptation of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters*. 189(1), 89-92.
- Rachon, G., Peñaloza, W. y Gibbs, P. A. 2016. Inactivation of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecium* NRRL B-2354 in a selection of low moisture foods. *International Journal of Food Microbiology*. 231, 16-25.
- Rajashekhara, E., Suresh, E. y Ethiraj, S. 1998. Thermal death rate of ascospores of *Neosartorya fischeri* ATCC 200957 in the presence of organic acids and preservatives in fruit juices. *Journal of Food Protection*. 61(10), 1358-1362.
- Raso, J. 2016. *Fundamental and applied aspects of pulsed electric fields for microbial inactivation*. Paper presented at the 1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies.
- Raso, J. y Barbosa-Cánovas, G. V. 2003. Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 43(3), 265-285.
- Raso, J., Calderón, M. a. L., Góngora-Nieto, M., Barbosa-Cánovas, G. y Swanson, B. G. 1998a. Inactivation of mold ascospores and conidiospores suspended in fruit juices by pulsed electric fields. *LWT-Food Science and Technology*. 31(7-8), 668-672.

- Raso, J., Góngora-Nieto, M. M., Barbosa-Cánovas, G. V. y Swanson, B. G. 1998b. Influence of several environmental factors on the initiation of germination and inactivation of *Bacillus cereus* by high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*. 44(1), 125-132.
- Rayman, M., Aris, B. y Derea, H. E. 1978. The effect of compounds which degrade hydrogen peroxide on the enumeration of heat-stressed cells of *Salmonella senftenberg*. *Canadian Journal of Microbiology*. 24(7), 883-885.
- Reddy, N., Solomon, H., Fingerhut, G., Rhodehamel, E., Balasubramaniam, V. y Palaniappan, S. 1999. Inactivation of *Clostridium botulinum* type E spores by high pressure processing. *Journal of Food Safety*. 19(4), 277-288.
- Redon, E., Loubiere, P. y Coccagn-Bousquet, M. 2005. Transcriptome analysis of the progressive adaptation of *Lactococcus lactis* to carbon starvation. *Journal of Bacteriology*. 187(10), 3589-3592.
- Reglamento (CE) Nº 2073/2005 [de la Comisión de las Comunidades Europeas de 15 de Noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, ed. DO L 338 de 22 de Diciembre 2005. Pág. 1-33.].
- Reineke, K., Mathys, A., Heinz, V. y Knorr, D. 2013. Mechanisms of endospore inactivation under high pressure. *Trends in Microbiology*. 21(6), 296-304.
- Renggli, S., Keck, W., Jenal, U. y Ritz, D. 2013. Role of autofluorescence in flow cytometric analysis of *Escherichia coli* treated with bactericidal antibiotics. *Journal of Bacteriology*. 195(18), 4067-4073.
- Richard, H. y Foster, J. W. 2004. *Escherichia coli* glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. *Journal of Bacteriology*. 186(18), 6032-6041.
- Riondet, C., Cachon, R., Waché, Y., Alcaraz, G. y Diviès, C. 1999. Changes in the proton-motive force in *Escherichia coli* in response to external oxidoreduction potential. *The FEBS Journal*. 262(2), 595-599.
- Riondet, C., Cachon, R., Waché, Y., i Bert, E. S., Gbaguidi, P., Alcaraz, G. y Divies, C. 2000. Combined action of redox potential and pH on heat resistance and growth recovery of sublethally heat-damaged *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 53(4), 476-479.
- Ritz, M., Tholozan, J., Federighi, M. y Pilet, M. 2001. Morphological and physiological characterization of *Listeria monocytogenes* subjected to high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(5), 2240-2247.
- Roberts, T., Gibson, A. M. y Robinson, A. 1981. Prediction of toxin production by *Clostridium botulinum* in pasteurized pork slurry. *International Journal of Food Science and Technology*. 16(4), 337-355.
- Roberts, T., Ingram, M. y Skulberg, A. 1965. The resistance of spores of *Clostridium botulinum* type E to heat and radiation. *Journal of Applied Microbiology*. 28(1), 125-141.
- Rodrigo, D., Ruíz, P., Barbosa-Cánovas, G., Martínez, A. y Rodrigo, M. 2003. Kinetic model for the inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology*. 81(3), 223-229.
- Rodríguez-Calleja, J., Cebrián, G., Condón, S. y Mañas, P. 2006. Variation in resistance of natural isolates of *Staphylococcus aureus* to heat, pulsed electric field and ultrasound under pressure. *Journal of Applied Microbiology*. 100(5), 1054-1062.
- Rodríguez, A., Larkin, J., Dunn, J., Patzaca, E., Reddy, N., Alvarez-Medina, M., Tetzloff, R. y Fleischman, G. 2004. Model of the inactivation of bacterial spores by moist heat and high pressure. *Journal of Food Science*. 69(8).
- Rodríguez, A., Smerage, G., Teixeira, A., Lindsay, J. y Busta, F. 1992. Population model of bacterial spores for validation of dynamic thermal processes. *Journal of Food Process Engineering*. 15(1), 1-30.

BIBLIOGRAFÍA

- Roe, A. J., O'Byrne, C., McLaggan, D. y Booth, I. R. 2002. Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. *Microbiology*. 148(7), 2215-2222.
- Roman, E. A. y González Flecha, F. L. 2014. Kinetics and thermodynamics of membrane protein folding. *Biomolecules*. 4(1), 354-373.
- Rose, R. E. 1988. The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucleic Acids Research*. 16(1), 355-355.
- Ross, E., Taub, I., Doona, C., Feeherry, F. y Kustin, K. 2005. The mathematical properties of the quasi-chemical model for microorganism growth–death kinetics in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 99(2), 157-171.
- Ross, T. y McMeekin, T. 1995. Predictive microbiology and HACCP. En: *HACCP in meat, poultry, and fish processing* (Pearson, A. M., Dutson, T.R. eds.), pp. 330-357. Springer.
- Roth, L. y Keenan, D. 1971. Acid injury of *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*. 17(8), 1005-1008.
- Rothfield, L., Taghbalout, A. y Shih, Y.-L. 2006. Spatial control of bacterial division-site placement. *Nature Reviews Microbiology*. 3, 959-968.
- Rotman, M. B. y Celada, F. 1968. Antibody-mediated activation of a defective beta-D-galactosidase extracted from an *Escherichia coli* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 60(2), 660-667.
- Rowan, N., Macgregor, S. J., Anderson, J., Fouracre, R. y Farish, O. 2000. Pulsed electric field inactivation of diarrhoeagenic *Bacillus cereus* through irreversible electroporation. *Letters in Applied Microbiology*. 31(2), 110-114.
- Rowan, N. J., MacGregor, S. J., Anderson, J. G., Cameron, D. y Farish, O. 2001. Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* by pulsed electric fields. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(6), 2833-2836.
- Rowbury, R. 1995. An assessment of environmental factors influencing acid tolerance and sensitivity in *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and other enterobacteria. *Letters in Applied Microbiology*. 20(6), 333-337.
- Ruiz, V. 2015. Efecto de la cisteína en la termorresistencia de *E. coli*. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Zaragoza.
- Runde, S., Molière, N., Heinz, A., Maisonneuve, E., Janczikowski, A., Elsholz, A. K., Gerth, U., Hecker, M. y Turgay, K. 2014. The role of thiol oxidative stress response in heat-induced protein aggregate formation during thermotolerance in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*. 91(5), 1036-1052.
- Russell, A. 2003. Lethal effects of heat on bacterial physiology and structure. *Science Progress*. 86(1-2), 115-137.
- Russell, A. y Harries, D. 1968a. Damage to *Escherichia coli* on exposure to moist heat. *Applied Microbiology*. 16(9), 1394-1399.
- Russell, A. y Harries, D. 1968b. Factors influencing the survival and revival of heat-treated *Escherichia coli*. *Applied Microbiology*. 16(2), 335-339.
- Russell, A. D. 1982. The destruction of bacterial spores. En: *Inhibition and destruction of the microbial cells* (Hugo, W., ed.), pp. 451-596. Elsevier.
- Ryu, J. H. y Beuchat, L. R. 1998. Influence of acid tolerance responses on survival, growth, and thermal cross-protection of *Escherichia coli* O157:H7 in acidified media and fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*. 45(3), 185-193.
- Sadiq, F. A., Li, Y., Liu, T., Flint, S., Zhang, G., Yuan, L., Pei, Z. y He, G. 2016. The heat resistance and spoilage potential of aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. *International Journal of Food Microbiology*. 238, 193-201.
- Sagarzazu, N. 2010. Estudio del desarrollo de respuestas de adaptación al estrés en microorganismos de interés en los alimentos. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.

- Sagarzazu, N., Cebrián, G., Pagán, R., Condón, S. y Mañas, P. 2010. Resistance of *Campylobacter jejuni* to heat and to pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 11(2), 283-289.
- Saldaña, G. 2011. Criterios de procesado para la pasteurización de alimentos por pulsos eléctricos de alto voltaje. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Saldaña, G., Monfort, S., Condón, S., Raso, J. y Álvarez, I. 2012. Effect of temperature, pH and presence of nisin on inactivation of *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed electric fields. *Food Research International*. 45(2), 1080-1086.
- Saldaña, G., Puértolas, E., Álvarez, I., Meneses, N., Knorr, D. y Raso, J. 2010a. Evaluation of a static treatment chamber to investigate kinetics of microbial inactivation by pulsed electric fields at different temperatures at quasi-isothermal conditions. *Journal of Food Engineering*. 100(2), 349-356.
- Saldaña, G., Puértolas, E., Condón, S., Álvarez, I. y Raso, J. 2010b. Modeling inactivation kinetics and occurrence of sublethal injury of a pulsed electric field-resistant strain of *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* in media of different pH. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 11(2), 290-298.
- Saldaña, G., Puértolas, E., López, N., García, D., Álvarez, I. y Raso, J. 2009. Comparing the PEF resistance and occurrence of sublethal injury on different strains of *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in media of pH 4 and 7. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 10(2), 160-165.
- Sale, A. y Hamilton, W. 1967a. Effects of high electric fields on microorganisms: I. Killing of bacteria and yeasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 148(3), 781-788.
- Sale, A. y Hamilton, W. 1967b. Effects of high electric fields on microorganisms: II. Mechanism of action of the lethal effect. *Biochimica et Biophysica Acta* 148(3), 789-800.
- San Martín, M., Barbosa-Cánovas, G. y Swanson, B. 2002. Food processing by high hydrostatic pressure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 42(6), 627-645.
- San Martín, M., Sepúlveda, D., Altunakar, B., Góngora-Nieto, M., Swanson, B. y Barbosa-Cánovas, G. 2007. Evaluation of selected mathematical models to predict the inactivation of *Listeria innocua* by pulsed electric fields. *LWT-Food Science and Technology*. 40(7), 1271-1279.
- Santo, C. E., Taudte, N., Nies, D. H. y Grass, G. 2008. Contribution of copper ion resistance to survival of *Escherichia coli* on metallic copper surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(4), 977-986.
- Sato, M., Ohgihama, T. y Clements, J. S. 1996. Formation of chemical species and their effects on microorganisms using a pulsed high-voltage discharge in water. *IEEE Transactions on Industry Applications*. 32(1), 106-112.
- Saulis, G. 2010. Electroporation of cell membranes: the fundamental effects of pulsed electric fields in food processing. *Food Engineering Reviews*. 2(2), 52-73.
- Saulis, G., Šatkauskas, S. y Pranevičiūtė, R. 2007. Determination of cell electroporation from the release of intracellular potassium ions. *Analytical Biochemistry*. 360(2), 273-281.
- Saulis, G. y Venslauskas, M. 1993a. Cell electroporation: Part 1. Theoretical simulation of the process of pore formation in a cell. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 32(3), 221-235.
- Saulis, G. y Venslauskas, M. 1993b. Cell electroporation: Part 2. Experimental measurements of the kinetics of pore formation in human erythrocytes. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 32(3), 237-248.
- Saulis, G., Venslauskas, M. y Naktinis, J. 1991. Kinetics of pore resealing in cell membranes after electroporation. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. 321(1), 1-13.
- Scheyhing, C., Hörmann, S., Ehrmann, M. y Vogel, R. 2004. Barotolerance is inducible by preincubation under hydrostatic pressure, cold-, osmotic- and acid-stress conditions in

BIBLIOGRAFÍA

- Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451T. *Letters in Applied Microbiology*. 39(3), 284-289.
- Schmeing, T. M. y Ramakrishnan, V. 2009. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature*. 461(7268), 1234.
- Schottroff, F., Krottenthaler, A. y Jaeger, H. 2017. Stress Induction and Response, Inactivation, and Recovery of Vegetative Microorganisms by Pulsed Electric Fields. En: *Handbook of Electroporation* (Miklavcic, D., ed.). Springer International Publishing.
- Schumann, W. 2007. Thermosensors in eubacteria: role and evolution. *Journal of Biosciences*. 32(3), 549-557.
- Seaver, L. C. y Imlay, J. A. 2004. Are respiratory enzymes the primary sources of intracellular hydrogen peroxide? *Journal of Biological Chemistry*. 279(47), 48742-48750.
- Serment-Moreno, V., Barbosa-Cánovas, G., Torres, J. A. y Welte-Chanes, J. 2014. High-pressure processing: kinetic models for microbial and enzyme inactivation. *Food Engineering Reviews*. 6(3), 56-88.
- Serrano, M. J. 2015. Estudio de la resistencia al calor de las principales bacterias patógenas de interés en alimentos. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Setlow, B. y Setlow, P. 1995. Small, acid-soluble proteins bound to DNA protect *Bacillus subtilis* spores from killing by dry heat. *Applied Environmental Microbiology*. 61(7), 2787-2790.
- Setlow, P. 2003. Spore germination. *Current Opinion in Microbiology*. 6(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(3), 514-525.
- Setlow, P. 2011. Resistance of bacterial spores. En: *Bacterial Stress Responses, Second Edition*, pp. 319-332. American Society of Microbiology.
- Setlow, P. 2014. Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know. *Journal of Bacteriology*. 196(7), 1297-1305.
- Setlow, P. 2016. Spore resistance properties. En: *The Bacterial Spore: from Molecules to Systems*, pp. 201-215. American Society of Microbiology.
- Setlow, P., Wang, S. y Li, Y.-Q. 2017. Germination of spores of the orders Bacillales and Clostridiales. *Annual Review of Microbiology*. 71, 459-477.
- Sevenich, R., Thieme, E., Hecht, P., Rauch, C. y Knorr, D. 2014. Baroprotective effect of solutes against the high pressure inactivation of *Bacillus amyloquefaciens* spores. Poster abstract. At IFT Annual Meeting 2014, New Orleans, LA, USA.
- Seward, R. A., Deibel, R. H. y Lindsay, R. C. 1982. Effects of potassium sorbate and other antibotulinal agents on germination and outgrowth of *Clostridium botulinum* type E spores in microcultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 44(5), 1212-1221.
- Shabala, L. y Ross, T. 2008. Cyclopropane fatty acids improve *Escherichia coli* survival in acidified minimal media by reducing membrane permeability to H⁺ and enhanced ability to extrude H⁺. *Research in Microbiology*. 159(6), 458-461.
- Shapiro, M. P., Setlow, B. y Setlow, P. 2004. Killing of *Bacillus subtilis* spores by a modified Fenton reagent containing CuCl₂ and ascorbic acid. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(4), 2535-2539.
- Sharma, V., Sakai, Y., Smythe, K. A. y Yokobayashi, Y. 2013. Knockdown of *recA* gene expression by artificial small RNAs in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 430(1), 256-259.
- Shearer, A. E., Mazzotta, A. S., Chuyate, R. y Gombas, D. E. 2002. Heat resistance of juice spoilage microorganisms. *Journal of Food Protection*. 65(8), 1271-1275.
- Shebuski, J. R., Vilhelmsson, O. y Miller, K. J. 2000. Effects of growth at low water activity on the thermal tolerance of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection*. 63(9), 1277-1281.
- Sherry, A., Patterson, M. y Madden, R. 2004. Comparison of 40 *Salmonella enterica* serovars injured by thermal, high-pressure and irradiation stress. *Journal of Applied Microbiology*. 96(4), 887-893.

- Sies, H. 1993. Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutation Research/Genetic Toxicology*. 299(3-4), 183-191.
- Silva, F. V. 2015. High pressure processing of milk: Modeling the inactivation of psychrotrophic *Bacillus cereus* spores at 38–70 °C. *Journal of Food Engineering*. 165, 141-148.
- Simpson, R. y Gilmour, A. 1997a. The effect of high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* in phosphate-buffered saline and model food systems. *Journal of Applied Microbiology*. 83(2), 181-188.
- Simpson, R. y Gilmour, A. 1997b. The effect of high hydrostatic pressure on the activity of intracellular enzymes of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*. 25(1), 48-53.
- Sinha, R. 1986. Toxicity of organic acids for repair-deficient strains of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 51(6), 1364-1366.
- Sissons, C., Perinpanayagam, H., Hancock, E. y Cutress, T. 1990. pH regulation of urease levels in *Streptococcus salivarius*. *Journal of Dental Research*. 69(5), 1131-1137.
- Skandamis, P. N., Yoon, Y., Stopforth, J. D., Kendall, P. A. y Sofos, J. N. 2008. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food Microbiology*. 25(2), 294-303.
- Smelt, J. 1998. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science and Technology*. 9(4), 152-158.
- Smelt, J. y Brul, S. 2014. Thermal inactivation of microorganisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 54(10), 1371-1385.
- Smelt, J., Rijke, A. y Hayhurst, A. 1994. Possible mechanism of high pressure inactivation of microorganisms. *International Journal of High Pressure Research*. 12(4-6), 199-203.
- Smelt, J. P., Hellemons, J. C., Wouters, P. C. y van Gerwen, S. J. 2002. Physiological and mathematical aspects in setting criteria for decontamination of foods by physical means. *International Journal of Food Microbiology*. 78(1), 57-77.
- Smiddy, M., O'Gorman, L., Sleator, R. D., Kerry, J. P., Patterson, M. F., Kelly, A. L. y Hill, C. 2005. Greater high-pressure resistance of bacteria in oysters than in buffer. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 6(1), 83-90.
- Smiddy, M., Sleator, R. D., Patterson, M. F., Hill, C. y Kelly, A. L. 2004. Role for compatible solutes glycine betaine and L-carnitine in Listerial barotolerance. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(12), 7555-7557.
- Smirnova, G., Muzyka, N., Lepekhina, E. y Oktyabrsky, O. 2016. Roles of the glutathione-and thioredoxin-dependent systems in the *Escherichia coli* responses to ciprofloxacin and ampicillin. *Archives of Microbiology*. 198(9), 913-921.
- Smirnova, G. y Oktyabrsky, O. 2005. Glutathione in bacteria. *Biochemistry* 70(11), 1199-1211.
- Smith, J. L. y Dell, B. J. 1990. Capability of selective media to detect heat-injured *Shigella flexneri*. *Journal of Food Protection*. 53(2), 141-144.
- Smulders, F. y Greer, G. 1998. Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: prospects and controversies. *International Journal of Food Microbiology*. 44(3), 149-169.
- Sobrino-López, A. y Martín-Belloso, O. 2006. Enhancing inactivation of *Staphylococcus aureus* in skim milk by combining high-intensity pulsed electric fields and nisin. *Journal of Food Protection*. 69(2), 345-353.
- Sofos, J. y Busta, F. 1981. Antimicrobial activity of sorbate. *Journal of Food Protection*. 44(8), 614-622.
- Somolinos, M. 2010. Implicación de las envolturas celulares en el mecanismo de inactivación microbiana mediante tecnologías emergentes de conservación: desarrollo de procesos combinados. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Somolinos, M., García, D., Mañas, P., Condón, S. y Pagán, R. 2008. Effect of environmental factors and cell physiological state on pulsed electric fields resistance and repair

BIBLIOGRAFÍA

- capacity of various strains of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*. 124(3), 260-267.
- Sonoike, K., Setoyama, T., Kuma, Y. y Kobayashi, S. 1992. Effect of pressure and temperature on the death rates of *Lactobacillus casei* and *Escherichia coli*. En: *Colloques-Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale. Colloques et seminaires*, pp. 297-297.
- Sorg, O. 2004. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies*. 327(7), 649-662.
- Sörqvist, S. 2003. Heat resistance in liquids of *Enterococcus* spp., *Listeria* spp., *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 44(1), 1.
- Souza, P. B., Poltronieri, K. F., Alvarenga, V. O., Granato, D., Rodriguez, A. D., Sant'Ana, A. S. y Peña, W. E. 2017. Modeling of *Byssochamys nivea* and *Neosartorya fischeri* inactivation in papaya and pineapple juices as a function of temperature and soluble solids content. *LWT-Food Science and Technology*. 82, 90-95.
- Spencer, R. y Baines, C. 1964. Effect of temperature on spoilage of wet white fish. I. Storage at constant temperatures between minus 1 degree + 25 degree C. *Food Technology*. 18(5), 769.
- Splittstoesser, D. 1991. Fungi of importance in processed fruits. En: *Handbook of Applied Mycology-Foods and Feeds* (Dekker, M., ed.), Vol. 3, pp. 201-219. New York: Marcel Dekker Inc.
- Stadtman, E. 1993. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annual Review of Biochemistry*. 62(1), 797-821.
- Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L. y Painter, P. R. 1992. *Microbiología*, 2nd ed. Barcelona. Reverté S.A.
- Stanier, R. Y. y Villanueva, J. R. 1996. *Microbiología*. Reverté.
- Stanley, D. W. y Parkin, K. L. 1991. Biological membrane deterioration and associated quality losses in food tissues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 30(5), 487-553.
- Stephens, P., Druggan, P. y Nebe-von Caron, G. 2000. Stressed *Salmonella* are exposed to reactive oxygen species from two independent sources during recovery in conventional culture media. *International Journal of Food Microbiology*. 60(2), 269-285.
- Stephens, P. y Mackey, B. 2003. Recovery of stressed microorganisms. *Progress in Industrial Microbiology*. 37, 25-48.
- Stewart, C. M., Jewett, F. F., Dunne, C. P. y Hoover, D. G. 1997. Effect of concurrent high hydrostatic pressure, acidity and heat on the injury and destruction of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Safety*. 17(1), 23-36.
- Stintzi, A. 2003. Gene expression profile of *Campylobacter jejuni* in response to growth temperature variation. *Journal of Bacteriology*. 185(6), 2009-2016.
- Storz, G., Tartaglia, L. A., Farr, S. B. y Ames, B. N. 1990. Bacterial defenses against oxidative stress. *Trends in Genetics*. 6, 363-368.
- Storz, G. y Zheng, M. 2000. Oxidative stress En: *Bacterial Stress Responses* (Storz, G., Hengge-Aronis, R., eds.), pp. 47-59. AMS Press. Wasington D.C.
- Stratford, M. y Eklund, T. 2003. Organic acids and esters. En: *Food Preservatives* (Russell, N. J., Gould, G.W., eds.), pp. 48-84. Boston, MA. Springer US.
- Stringer, S., George, S. y Peck, M. 2000. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology*. 88(S1), 79S-89S.
- Suh, J. H. y Knabel, S. J. 2000. Comparison of different reducing agents for enhanced detection of heat-injured *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 63(8), 1058-1063.
- Sumner, S., Sandros, T., Harmon, M., Scott, V. y Bernard, D. 1991. Heat resistance of *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in sucrose solutions of various water activities. *Journal of Food Science*. 56(6), 1741-1743.

- Sun, B., Sato, M. y Clements, J. S. 1997. Optical study of active species produced by a pulsed streamer corona discharge in water. *Journal of Electrostatics*. 39(3), 189-202.
- Sun, B., Sato, M., Harano, A. y Clements, J. 1998. Non-uniform pulse discharge-induced radical production in distilled water. *Journal of Electrostatics*. 43(2), 115-126.
- Sunde, E. P., Setlow, P., Hederstedt, L. y Halle, B. 2009. The physical state of water in bacterial spores. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106(46), 19334-19339.
- Syamaladevi, R. M., Tang, J., Villa-Rojas, R., Sablani, S., Carter, B. y Campbell, G. 2016. Influence of water activity on thermal resistance of microorganisms in low-moisture foods: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 15(2), 353-370.
- Takahashi, K. 1992. Sterilization of microorganisms by hydrostatic pressure at low temperature. En: *High Pressure and Biotechnology* (Balny, C., Hayashi, R., Hereman, K. y Masson, P., eds.), Vol. 224, pp. 303-303. Colloque INSERM, John Libbey Eurotext Ltd.: London.
- Talukdar, P. K., Udombijitkul, P., Hossain, A. y Sarker, M. R. 2017. Inactivation strategies for *Clostridium perfringens* spores and vegetative cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 83(1), e02731-02716.
- Tan, I. S. y Ramamurthi, K. S. 2014. Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environmental Microbiology Reports*. 6(3), 212-225.
- Tanino, T., Sato, S., Oshige, M. y Ohshima, T. 2012. Analysis of the stress response of yeast *Saccharomyces cerevisiae* toward pulsed electric field. *Journal of Electrostatics*. 70(2), 212-216.
- Teixeira, P., Castro, H., Mohácsi-Farkas, C. y Kirby, R. 1997. Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress. *Journal of Applied Microbiology*. 83(2), 219-226.
- Tennen, R., Setlow, B., Davis, K., Loshon, C. y Setlow, P. 2000. Mechanisms of killing of spores of *Bacillus subtilis* by iodine, glutaraldehyde and nitrous acid. *Journal of Applied Microbiology*. 89(2), 330-338.
- Tholozan, J., Ritz, M., Jugiau, F., Federighi, M. y Tissier, J. 2000. Physiological effects of high hydrostatic pressure treatments on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Applied Microbiology*. 88(2), 202-212.
- Ting, E., Balasubramaniam, V. y Raghubeer, E. 2002. Determining thermal effects in high-pressure processing. *Food Technology*. 56(2), 31-35.
- Toepfl, S., Heinz, V. y Knorr, D. 2006. Applications of pulsed electric fields technology for the food industry. En: *Pulsed electric fields technology for the food industry* (Raso, J., Heinz, V., eds.), pp. 197-221. Springer: Nueva York.
- Tomlins, R. y Ordal, Z. J. 1976. Thermal injury and inactivation in vegetative bacteria. En: *Inhibition and inactivation of vegetative microbes* (Skinner, F. A., Hugo, W.A., eds.), Vol. 5, pp. 153-191. Academic Press.
- Tomlins, R., Watkins, T. y Gray, R. 1982. Membrane lipid alterations and thermal stress in *Salmonella typhimurium* 7136. *Applied and Environmental Microbiology*. 44(5), 1110-1117.
- Tripathi, P., Beaussart, A., Andre, G., Rolain, T., Lebeer, S., Vanderleyden, J., Hols, P. y Dufrêne, Y. F. 2012. Towards a nanoscale view of lactic acid bacteria. *Micron*. 43(12), 1323-1330.
- Tsong, T. Y. 1991. Electroporation of cell membranes. *Biophysical Journal*. 60(2), 297-306.
- Tsuchido, T., Katsui, N., Takeuchi, A., Takano, M. y Shibasaki, I. 1985. Destruction of the outer membrane permeability barrier of *Escherichia coli* by heat treatment. *Applied and Environmental Microbiology*. 50(2), 298-303.
- Tyedmers, J., Mogk, A. y Bukau, B. 2010. Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 11(11), 777-788.
- Uchida, A., Harada, K. y Kadota, H. 1979. Heat-induced DNA injury and its repair in *Micrococcus radiodurans*. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 45(8), 995-999.

BIBLIOGRAFÍA

- Ugborogho, T. y Ingham, S. 1994. Increased D-values of *Staphylococcus aureus* resulting from anaerobic heating and enumeration of survivors. *Food Microbiology*. 11(4), 275-280.
- Ukuku, D., Yuk, H. y Zhang, H. 2010. Behavior of pulsed electric fields injured *Escherichia coli* O157:H7 cells in apple juice amended with pyruvate and catalase. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*. 2(6).
- Ulmer, H., Heinz, V., Gänzle, M., Knorr, D. y Vogel, R. 2002. Effects of pulsed electric fields on inactivation and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* in model beer. *Journal of Applied Microbiology*. 93(2), 326-335.
- Ulmer, H. M., Gänzle, M. G. y Vogel, R. F. 2000. Effects of high pressure on survival and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* TMW1. 460. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(9), 3966-3973.
- Unal, R., Kim, J. G. y Yousef, A. E. 2001. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Lactobacillus leichmannii* by combinations of ozone and pulsed electric field. *Journal of Food Protection*. 64(6), 777-782.
- Uden, G., Trageser, M. y Duchene, A. 1990. Effect of positive redox potentials (>+ 400mV) on the expression of anaerobic respiratory enzymes in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 4(2), 315-319.
- van Boekel, M. A. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*. 74(1), 139-159.
- van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D. y Maguin, E. 2002. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 82(1-4), 187-216.
- Van der Veen, S., Hain, T., Wouters, J. A., Hossain, H., de Vos, W. M., Abee, T., Chakraborty, T. y Wells-Bennik, M. H. 2007. The heat-shock response of *Listeria monocytogenes* comprises genes involved in heat shock, cell division, cell wall synthesis, and the SOS response. *Microbiology*. 153(10), 3593-3607.
- Van Heesch, E., Pemen, A., Huijbrechts, P. A., van der Laan, P. C., Prasinski, K., Zanstra, G. J. y de Jong, P. 2000. A fast pulsed power source applied to treatment of conducting liquids and air. *IEEE Transactions on Plasma Science*. 28(1), 137-143.
- Van Opstal, I., Vanmuysen, S. C. y Michiels, C. W. 2003. High sucrose concentration protects *E. coli* against high pressure inactivation but not against high pressure sensitization to the lactoperoxidase system. *International Journal of Food Microbiology*. 88(1), 1-9.
- Van Opstal, I., Vanmuysen, S. C., Wuytack, E. Y., Masschalck, B. y Michiels, C. W. 2005. Inactivation of *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure at different temperatures in buffer and carrot juice. *International Journal of Food Microbiology*. 98(2), 179-191.
- Vanlint, D., Rutten, N., Govers, S. K., Michiels, C. W. y Aertsen, A. 2013. Exposure to high hydrostatic pressure rapidly selects for increased RpoS activity and general stress-resistance in *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*. 163(1), 28-33.
- Vega-Mercado, H., Pothakamury, U. R., Chang, F.-J., Barbosa-Cánovas, G. V. y Swanson, B. G. 1996. Inactivation of *Escherichia coli* by combining pH, ionic strength and pulsed electric fields hurdles. *Food Research International*. 29(2), 117-121.
- Velliou, E. G., Van Derlinden, E., Cappuyns, A. M., Goossens, J., Geeraerd, A. H., Devlieghere, F. y Van Impe, J. F. 2011. Heat adaptation of *Escherichia coli* K12: effect of acid and glucose. *Procedia Food Science*. 1, 987-993.
- Vercammen, A., Vivijis, B., Lurquin, I. y Michiels, C. W. 2012. Germination and inactivation of *Bacillus coagulans* and *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by high hydrostatic pressure treatment in buffer and tomato sauce. *International Journal of Food Microbiology*. 152(3), 162-167.
- Virto, R., Mañas, P., Álvarez, I., Condón, S. y Raso, J. 2005a. Membrane damage and microbial inactivation by chlorine in the absence and presence of a chlorine-demanding substrate. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(9), 5022-5028.

- Virto, R., Sanz, D., Álvarez, I., Condón, S. y Raso, J. 2006. Application of the Weibull model to describe inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* by citric and lactic acid at different temperatures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86(6), 865-870.
- Virto, R., Sanz, D., Álvarez, I. y Raso, J. 2005b. Inactivation kinetics of *Yersinia enterocolitica* by citric and lactic acid at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology*. 103(3), 251-257.
- Waites, W. y Bayliss, C. E. 1984. Damage to bacterial spores by combined treatments and possible revival and repair processes. En: *The revival of injured microbes* (Andrew, M. H. E., Russell, A.D. eds.). Academic Press.
- Wang, D., Wang, C., Wu, H., Li, Z. y Ye, Q. 2016a. Glutathione production by recombinant *Escherichia coli* expressing bifunctional glutathione synthetase. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 43(1), 45-53.
- Wang, L. H., Wang, M. S., Zeng, X. A. y Liu, Z. W. 2016b. Temperature-mediated variations in cellular membrane fatty acid composition of *Staphylococcus aureus* in resistance to pulsed electric fields. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1858(8), 1791-1800.
- Wang, T., Lu, W., Lu, S. y Kong, J. 2015. Protective role of glutathione against oxidative stress in *Streptococcus thermophilus*. *International Dairy Journal*. 45, 41-47.
- Wang, T., Xu, Z., Lu, S., Xin, M. y Kong, J. 2016c. Effects of glutathione on acid stress resistance and symbiosis between *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *International Dairy Journal*. 61, 22-28.
- Wang, X., Devlieghere, F., Geeraerd, A. y Uyttendaele, M. 2017. Thermal inactivation and sublethal injury kinetics of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in broth versus agar surface. *International Journal of Food Microbiology*. 243, 70-77.
- Wang, X., Perez, E., Liu, R., Yan, L. J., Mallet, R. T. y Yang, S. H. 2007. Pyruvate protects mitochondria from oxidative stress in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Brain Research*. 1132, 1-9.
- Wang, X., Zhao, X., Malik, M. y Drlica, K. 2010. Contribution of reactive oxygen species to pathways of quinolone-mediated bacterial cell death. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 65(3), 520-524.
- Watanabe, M., van der Veen, S. y Abee, T. 2012. Impact of respiration on resistance of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 to acid stress. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(11), 4062-4064.
- Welin, J., Wilkins, J. C., Beighton, D., Wrzesinski, K., Fey, S. J., Mose-Larsen, P., Hamilton, I. R. y Svensäter, G. 2003. Effect of acid shock on protein expression by biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters*. 227(2), 287-293.
- Wemekamp-Kamphuis, H. H., Wouters, J. A., de Leeuw, P. P., Hain, T., Chakraborty, T. y Abee, T. 2004. Identification of sigma factor σ^B -controlled genes and their impact on acid stress, high hydrostatic pressure, and freeze survival in *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(6), 3457-3466.
- Wesche, A. M., Gurtler, J. B., Marks, B. P. y Ryser, E. T. 2009. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*. 72(5), 1121-1138.
- Whiteman, M. y Halliwell, B. 1997. Thiourea and dimethylthiourea inhibit peroxynitrite-dependent damage: nonspecificity as hydroxyl radical scavengers. *Free Radical Biology and Medicine*. 22(7), 1309-1312.
- Whiting, R. y Golden, M. 2002. Variation among *Escherichia coli* O157:H7 strains relative to their growth, survival, thermal inactivation, and toxin production in broth. *International Journal of Food Microbiology*. 75(1), 127-133.
- Wilde, S., Jørgensen, F., Campbell, A., Rowbury, R. y Humphrey, T. 2000. Growth of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4 in media containing glucose results in enhanced RpoS-

BIBLIOGRAFÍA

- independent heat and acid tolerance but does not affect the ability to survive air-drying on surfaces. *Food Microbiology*. 17(6), 679-686.
- Wilson, M. J. y Baker, R. 2001. High temperature/ultra high pressure sterilization of foods. Patente EE.UU. 6. 207 215.
- Wisselink, H., Weusthuis, R., Eggink, G., Hugenholtz, J. y Grobben, G. 2002. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *International Dairy Journal*. 12(2), 151-161.
- Wolf, S. G., Frenkiel, D., Arad, T. y Finkel, S. E. 1999. DNA protection by stress-induced biocrystallization. *Nature*. 400(6739), 83.
- Wood, J. M. 2011. Bacterial osmoregulation: a paradigm for the study of cellular homeostasis. *Annual Review of Microbiology*. 65, 215-238.
- Wouters, P. C., Alvarez, I. y Raso, J. 2001. Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing. *Trends in Food Science and Technology*. 12(3), 112-121.
- Wouters, P. C., Dutreux, N., Smelt, J. P. y Lelieveld, H. L. 1999. Effects of pulsed electric fields on inactivation kinetics of *Listeria innocua*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(12), 5364-5371.
- Wouters, P. C., Glaasker, E. y Smelt, J. P. 1998. Effects of high pressure on inactivation kinetics and events related to proton efflux in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(2), 509-514.
- Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R. y Turner, N. D. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of Nutrition*. 134(3), 489-492.
- Wuytack, E. Y., Phuong, L. D. T., Aertsen, A., Reyns, K., Marquenie, D., De Ketelaere, B., Masschalck, B., Van Opstal, I., Diels, A. y Michiels, C. 2003. Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by heat and by different nonthermal treatments. *Journal of Food Protection*. 66(1), 31-37.
- Xu, X. Q., Shi, Y., Wu, X. B., Zhan, X. L., Zhou, H. T. y Chen, Q. X. 2015. Heat inactivation kinetics of *Hypocrea orientalis* β -glucosidase with enhanced thermal stability by glucose. *International Journal of Biological Macromolecules*. 81, 1012-1018.
- Yan, Y., Waite-Cusic, J. G., Kuppusamy, P. y Yousef, A. E. 2013. Intracellular free iron and its potential role in ultrahigh-pressure-induced inactivation of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 79(2), 722-724.
- Yang, Y. T., Bennett, G. N. y San, K. Y. 2001. The effects of feed and intracellular pyruvate levels on the redistribution of metabolic fluxes in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*. 3(2), 115-123.
- Yao, J., Zhou, B., Wang, R., Wang, T., Hu, X., Liao, X. y Zhang, Y. 2015. Inactivation of *Staphylococcus aureus* by high hydrostatic pressure in saline solution and meat slurry with different initial inoculum levels. *Food and Bioprocess Technology*. 94, 592-600.
- Young, S. y Setlow, P. 2003. Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. *Journal of Applied Microbiology*. 95(1), 54-67.
- Yousef, A. E. y Juneja, V. K. 2002. *Microbial stress adaptation and food safety*. CRC Press.
- Yura, T., Kanemori, M. y Morita, M. T. 2000. The heat shock response: regulation and function. En: *Bacterial stress responses* (Storz, G., Hengge-Aronis, R., eds.), pp. 3-18. Washington D.C. ASM Press.
- Zhang, J., Fu, R. Y., Hugenholtz, J., Li, Y. y Chen, J. 2007. Glutathione protects *Lactococcus lactis* against acid stress. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(16), 5268-5275.
- Zhang, J., Quan, C., Wang, C., Wu, H., Li, Z. y Ye, Q. 2016. Systematic manipulation of glutathione metabolism in *Escherichia coli* for improved glutathione production. *Microbial Cell Factories*. 15(1), 38.
- Zhang, Q., Barbosa-Cánovas, G. V. y Swanson, B. G. 1995. Engineering aspects of pulsed electric field pasteurization. *Journal of Food Engineering*. 25(2), 261-281.

- Zhang, Q., Chang, F. J., Barbosa-Cánovas, G. V. y Swanson, B. G. 1994a. Inactivation of microorganisms in a semisolid model food using high voltage pulsed electric fields. *LWT-Food Science and Technology*. 27(6), 538-543.
- Zhang, Q., Monsalve-González, A., Barbosa-Cánovas, G. V. y Swanson, B. G. 1994b. Inactivation of *E. coli* and *S. cerevisiae* by pulsed electric fields under controlled temperature conditions. *Transactions of the ASAE*. 37(2), 581-587.
- Zhao, W., Yang, R., Gu, Y.-j., Tang, Y. y Li, C. 2014. Assessment of pulsed electric fields induced cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*: Change in performance of mitochondria and cellular enzymes. *LWT - Food Science and Technology*. 58(1), 55-62.
- Zhao, W., Yang, R., Shen, X., Zhang, S. y Chen, X. 2013. Lethal and sublethal injury and kinetics of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in milk by pulsed electric fields. *Food Control*. 32(1), 6-12.
- Zielonka, J. y Kalyanaraman, B. 2010. Hydroethidine-and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: another inconvenient truth. *Free Radical Biology and Medicine*. 48(8), 983-1001.
- Zimmermann, U., Pilwat, G. y Riemann, F. 1974. Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophysical Journal*. 14(11), 881-899.
- Zuber, P. 2009. Management of oxidative stress in *Bacillus*. *Annual Review of Microbiology*. 63, 575-597.

