



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

Estudio de la salida de componentes intracelulares tras la exposición de *Staphylococcus aureus* a diferentes tratamientos de pulsos eléctricos de alto voltaje.

Release of intracellular compounds after exposure of *Staphylococcus aureus* to different pulsed electric fields treatments.

Autor/es

Víctor Freire Carrascosa.

Director/es

Pilar Mañas Pérez y Guillermo Cebrián Auré.

Facultad de Veterinaria

2016

ÍNDICE:

1) RESUMEN	1
2) INTRODUCCIÓN	3
2.1. Los pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV)	3
2.2. Factores de los que depende el efecto de los PEAV	3
2.2.1. Parámetros de tratamiento	3
2.2.2. Factores que influyen antes del tratamiento de PEAV	5
2.2.3. Factores que influyen durante el tratamiento de PEAV	6
2.2.4. Factores que influyen después del tratamiento de PEAV	6
2.3. Mecanismo de acción de los PEAV	7
2.4. Salida de componentes intracelulares	8
2.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	9
3) JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	11
4) MATERIAL Y MÉTODOS	12
4.1. Preparación de medios de tratamiento y crecimiento	12
4.2. Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i>	12
4.3. Tratamiento por PEAV	13
4.4. Recuperación, recuento en placa y parámetros de resistencia	13
4.5. Tinción por yoduro de propidio	14
4.6. Cuantificación y caracterización de las proteínas liberadas	16
4.7. Medida de la salida de componentes intracelulares	20
5) RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
5.1. Comparación entre la tinción con IP y la sensibilización al NaCl	22
5.2. Inactivación de <i>S. aureus</i> en medios de pH 7,0	23
5.3. Inactivación de <i>S. aureus</i> en medios de pH 4,0	25
5.4. Salida de componentes intracelulares en medios de pH 7,0	26
5.5. Salida de componentes intracelulares en medios de pH 4,0	29
5.6. Relación entre la salida de componentes y daño subletal	29
6) CONCLUSIONES	32
7) APORTACIONES EN MATERIA DE APRENDIZAJE	34
8) BIBLIOGRAFÍA	35

1) RESUMEN:

Los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEAV) son una de las denominadas nuevas tecnologías de conservación de los alimentos y consiste en la aplicación de un campo eléctrico de alto voltaje (5-50 kV/cm) en forma de pulsos cuya duración es generalmente del orden de microsegundos (1-100 μ s). Uno de los principales problemas de cara a su implementación industrial es que su modo de acción sobre los microorganismos aún no ha sido del todo esclarecido.

El objetivo de este trabajo fin de grado es cuantificar y caracterizar las proteínas que resultan liberadas al medio extracelular tras exponer a células de *Staphylococcus aureus* a tratamientos de PEAV que conduzcan a diferentes grados de permeabilización y/o inactivación celular. Con ello se pretende contribuir al conocimiento de los mecanismos celulares implicados en la inactivación y en la supervivencia de los microorganismos de interés en los alimentos frente a esta tecnología.

Para ello se obtuvieron cultivos en fase estacionaria de *S. aureus* que fueron sometidos a diferentes tratamientos de PEAV. Una vez conocidos ciertos parámetros (porcentajes de inactivación y permeabilización celular) se procedió a cuantificar y caracterizar las proteínas liberadas al medio extracelular tras los tratamiento por Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje para lo que se utilizaron diferentes técnicas (espectrofotometría UV, métodos Bradford y BCA).

Los resultados obtenidos demostraron que la inactivación, la permeabilización y la salida de componentes intracelulares de las células de *S. aureus* por los PEAV eran mayores a mayor intensidad de campo eléctrico y a mayor duración del tratamiento. La acidificación del medio de tratamiento resultó en una mayor inactivación pero no en un aumento de la permeabilización ni de la salida de componentes intracelulares.

Además en las condiciones estudiadas, no se observó una correlación entre la proporción de células dañadas subletalmente y la cantidad de material intracelular liberado al medio.

1) ABSTRACT:

Pulsed electric fields (PEF) is a novel non-thermal technology for food preservation consisting in the application of short duration (1-100 μ s) high electric field pulses (5-50 kV/cm) to food placed between two electrodes. One of the major issues regarding its industrial implementation is that its mechanism of action on microorganisms remains to be fully elucidated.

The aim of this work is to quantify and characterize the proteins released to the extra-cellular medium after the exposure of *Staphylococcus aureus* cells to different PEF treatments which lead to different degrees of permeabilization and/or cell inactivation.

To accomplish this goal, stationary phase cultures of *S. aureus* were obtained and then, they were exposed to different PEF treatments.

Once the percentages of cell permeabilization and inactivation attained after these treatments were determined, the amount of intracellular components –UV absorbing material and proteins- released to the medium was quantified and characterized using different techniques such as UV spectrophotometry and Bradford and BCA methods.

Results obtained indicate that inactivation, permeabilization and leakage of intracellular compounds from *S. aureus* cells increase with electric field intensity and treatment time. Acidification of the treatment medium increases the lethality of PEF treatments on *S. aureus* cells. Conversely, it does not increase bacterial permeabilization or the amount of intracellular compounds released.

In addition, under our experimental conditions, no relation between the proportion of sublethally damaged cells and the amount of intracellular compounds released after PEF was found.

2) INTRODUCCIÓN:

2.1. Los pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV):

Los tratamientos térmicos son una tecnología muy efectiva para la inactivación microbiana, sin embargo, su aplicación puede causar efectos indeseables en los alimentos como desnaturalización proteica, pardeamiento no enzimático (Maillard), además de pérdida de vitaminas y de compuestos volátiles. Por ello, y dado el creciente interés de los consumidores en alimentos de mayor calidad sensorial y nutritiva, se están desarrollando tecnologías alternativas a dichos tratamientos térmicos como los PEAV.

Esta tecnología consiste en la aplicación de campos eléctricos en el rango de 5-50 kV/cm en forma de pulsos con una duración del orden de μs , a un alimento situado entre dos electrodos (Álvarez y col., 2006). Este tratamiento es capaz de inactivar a los microorganismos a temperaturas muy inferiores (y no letales) a las de los tratamientos térmicos (Álvarez y col., 2006). El mecanismo por el cual se inactivan los microorganismos aún no ha sido plenamente determinado, sin embargo generalmente se asume que los PEAV provocan la permeabilización de las membranas microbianas.

2.2. Factores de los que depende el efecto de los PEAV:

Los factores que influyen en el efecto letal de los PEAV son muchos, y se pueden clasificar de manera general en cuatro grupos: los parámetros de tratamiento, los factores dependientes del tipo de microorganismo y su estado fisiológico, los factores que actúan durante el tratamiento y los que actúan después.

2.2.1. Parámetros de tratamiento:

La intensidad del campo eléctrico:

Es el parámetro más importante de todos. Se ha demostrado que, de forma general, aumentar el campo eléctrico aplicado conduce a un incremento en la letalidad de los tratamientos por PEAV. Normalmente se expresa en kV/cm aunque en el S.I. se expresa en V/m ya que:

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

Donde E, es la intensidad del campo eléctrico, que se define con la diferencia de potencial (V) existente entre dos electrodos con una distancia (d) entre ellos. Al

aumentar la diferencia de potencial y/o reducir la distancia entre electrodos, aumentamos el campo eléctrico.

La forma del pulso (cuadrado o de caída exponencial):

Existen dos formas de pulsos, los de caída exponencial y los de onda cuadrada, los primeros se caracterizan por un rápido aumento de V que posteriormente decae de forma progresiva, mientras que los pulsos de onda cuadrada tras el incremento se mantiene un determinado tiempo y desciende súbitamente.

Desde un punto de vista práctico, los pulsos de onda cuadrada se consideran más adecuados para los estudios básicos y acerca del mecanismo de acción ya que se considera que en los de caída exponencial la energía en la fase de descenso no siempre tiene efecto inactivante y únicamente contribuiría a aumentar la temperatura del medio de tratamiento.

Por el contrario, en los de onda cuadrada casi toda la energía se aplica al máximo voltaje y además es posible aplicar mayores frecuencias y calcular el tiempo exacto de tratamiento con precisión. Como ventaja los pulsos de caída exponencial soportan mayores corrientes y voltajes (100 kV y 1 MA) y los equipos para generarlos son más baratos (Cebrián, 2009)

Polaridad:

Ambos pueden ser mono o bipolares, estos últimos tras la aplicación de un pulso de una polaridad aplican otro de polaridad contraria, esto mejora ligeramente la inactivación y previene el depósito de componentes en los electrodos.

Anchura de pulso:

Para caída exponencial se define como el tiempo durante el cual el voltaje es superior al 37% del máximo alcanzado en la descarga, para los de onda cuadrada la anchura de pulso coincide con la duración del mismo.

Tiempo de tratamiento:

Es el producto del número de pulsos por la anchura de estos.

Frecuencia:

Número de pulsos aplicados por unidad de tiempo, suele estar entre 1-5000 Hz, tiene sobre todo un efecto en la temperatura.

2.2.2. Factores que influyen antes del tratamiento de PEAV:

Tipo de microorganismo:

Los PEAV son capaces de inactivar células vegetativas, levaduras y hongos sin embargo las esporas bacterianas son resistentes a esta tecnología (citado de Álvarez y col., 2006).

Tamaño y forma celular:

En general se describe que las células de mayor tamaño como las levaduras son más sensibles a los PEAV. De acuerdo a los cálculos teóricos las células bacilares serían más resistentes que las esféricas. No obstante se han descrito numerosas excepciones a estas reglas en la bibliografía (Álvarez y col., 2006).

Condiciones de cultivo:

Se ha demostrado que las células en fase exponencial son más sensibles a los PEAV (Cebrián y col., 2007) que aquellas que están en su fase estacionaria, esto podría deberse al mayor tamaño de las células en la fase exponencial (Ohshima y Sato, 2004). Por el contrario, existen divergencias en los resultados obtenidos acerca de la influencia de la temperatura de crecimiento. Mientras algunos autores han observado que aquellos cultivos incubados a temperaturas óptimas son menos sensibles que aquellos incubados a temperaturas sub-óptimas (Álvarez y col., 2002; Álvarez y col., 2003), otros autores no han observado diferencias en la resistencia de las células crecidas a diferentes temperaturas, como es el caso de Arroyo(2008) estudiando *Enterobacter sakazakii* crecido entre 10 y 37 °C, o Álvarez y col.(2003b) comparando la resistencia a los PEAV de *Yersinia enterocolitica* crecida a 4y 30 °C (citado en Cebrián,2009).

Estas diferencias suelen ser de como máximo 1 unidad logarítmica y su causa podrían ser las distintas sensibilidades a los PEAV a temperaturas de crecimiento bajas, ya que el grado de insaturación de los ácidos grasos o de los fosfolípidos de la membrana aumenta, lo que podría incrementar la fluidez de la membrana (Cebrián, 2009). Esta mayor fluidez reduciría la estabilidad frente a tratamientos de PEAV, disminuyendo la resistencia bacteriana a esta tecnología.

A pesar de esto, Cebrián (2009) demostró este aumento de fluidez de la membrana a temperaturas bajas de cultivo, pero sin embargo, no obtuvo en *S. aureus* los resultados esperados de una menor resistencia a estas temperaturas ligada a la mayor

fluidez de la membrana, con lo que aún no ha quedado establecido el motivo de estas pequeñas variaciones de resistencia observadas por algunos autores.

2.2.3. Factores que influyen durante el tratamiento de PEAV:

Temperatura:

El efecto letal de esta tecnología se incrementa con la temperatura del medio de tratamiento de forma sinérgica. Este incremento se observa tanto a temperaturas subletales como letales (Álvarez y col., 2006).

Coster y Zimmermann (1975) indicaron que el incremento en la velocidad de inactivación con la temperatura podría deberse a una disminución del potencial transmembrana mínimo requerido para causar la electroporación de las membranas celulares. Esta disminución estaría relacionada con la temperatura debido a la transición de los fosfolípidos de estado de gel a estado líquido-cristalino (Stanley, 1991).

pH y a_w :

Se ha llegado a la conclusión de que la influencia del pH en el efecto de los PEAV está ligada con el tipo de microorganismo, siendo las células G⁺ más resistentes a los PEAV que las G⁻. Sin embargo a pH ácido como 4,0, esta relación puede invertirse haciendo que las G⁻, sean igual o más resistentes (García y col., 2005 a, b).

Por otra parte se ha observado que la reducción de la a_w del medio de tratamiento puede llevar a un aumento de la resistencia microbiana a los PEAV de varias bacterias y levaduras (Álvarez y col., 2000, 2002, 2003b; Aronsson y Ronner, 2001).

Conductividad:

La mayoría de los estudios realizados concluyen que la conductividad afecta a la inactivación microbiana por PEF, aunque se desconoce si este efecto se produce por la influencia de la conductividad en otros parámetros como son la intensidad del campo eléctrico, la anchura de pulso o la temperatura, o si influye en el mecanismo de acción de los PEAV por sí misma.

2.2.4) Factores que influyen después del tratamiento de PEAV:

De entre los factores que pueden influir en la resistencia microbiana tras la aplicación de tratamientos de PEAV los que más se han estudiado son las características de los medios de recuperación. Así, cabe destacar que se ha demostrado que el pH ácido

y elevadas concentraciones de NaCl en el medio de recuperación son capaces de impedir la reparación de la membrana celular, lo que conduce a un incremento en el número de células inactivadas.

Exponer a un microorganismo a determinadas tecnologías como los PEAV puede dar lugar a la inactivación de este, pero también a alteraciones en diferentes componentes como proteínas o el DNA que no sean suficientemente significativas como para inactivarlo. Este tipo de alteraciones denotan a las células dañadas subletalmente, que tras la reparación de estas lesiones pueden multiplicarse si las condiciones del medio lo permiten. La cantidad de daño depende de qué agente provoca las lesiones, del tipo de microorganismo y de las condiciones de tratamiento (Cebrián, 2009).

2.3. Mecanismo de acción de los PEAV:

Según la teoría, en general, más aceptada, la permeabilización de las membranas biológicas mediante la aplicación de PEAV es debida a fenómenos de compresión electromecánica. Así, como consecuencia de la aplicación de los PEAV se acumulan cargas de distinto signo a ambos lados de la membrana, comprimiéndola hasta que llegan a perforarla, lo cual produce la aparición de poros en la membrana (teoría de la electroporación de Zimmermann) (Zimmermann y col., 1974).

Como consecuencia de los tratamientos de PEAV se puede producir una permeabilización reversible, los trabajos de García y col. (2003, 2005a y 2005b) demostraron que, en la mayoría de los casos, las células Gram-negativas resultaban subletalmente dañadas cuando eran tratadas por PEAV a pH ácido, mientras que las células Gram-positivas solo mostraban daño si eran tratadas a pH neutro. Estas condiciones de tratamiento coincidían con la aparición de poros de naturaleza reversible en la membrana citoplasmática por lo que la presencia de daño subletal es dependiente, al menos, del tipo de microorganismo y pH de tratamiento.

O por el contrario, también se puede producir una permeabilización irreversible que conlleve la lisis y/o la inactivación celular. Los factores que condicionan la aparición de uno u otro tipo de permeabilización y/o la posible conversión de la permeabilización reversible en irreversible no son del todo conocidos aunque de forma general se asume que la aplicación de tratamientos de mayor intensidad y unas condiciones de recuperación desfavorables resultan en un incremento en la proporción de células permeabilizadas irreversiblemente. Otros factores, como las características

del medio de tratamiento anteriormente mencionadas, también pueden afectar a esta proporción (Cebrián, 2009).

2.4. Salida de componentes intracelulares:

Existen numerosos estudios acerca de la salida de componentes intracelulares tras la aplicación de tratamientos por PEAV a las células microbianas. Desafortunadamente, la mayoría de estos estudios están encaminados al estudio de esta tecnología como un sistema de extracción de componentes y su diseño no permite extraer conclusiones acerca del posible impacto que la salida de los diferentes componentes tendría en la viabilidad celular.

En relación a la salida de proteínas, los principales componentes que se han estudiado en este trabajo, cabe señalar que en los estudios de extracción, en general, la ruptura celular para la recuperación de proteínas intracelulares se lleva a cabo mediante ultrasonidos u homogenización, lo que produce la ruptura total de la célula y la liberación de todo el material intracelular y de las envolturas. Por el contrario, los PEAV parecen permitir la salida selectiva de proteínas intracelulares (Véase Figura 1).

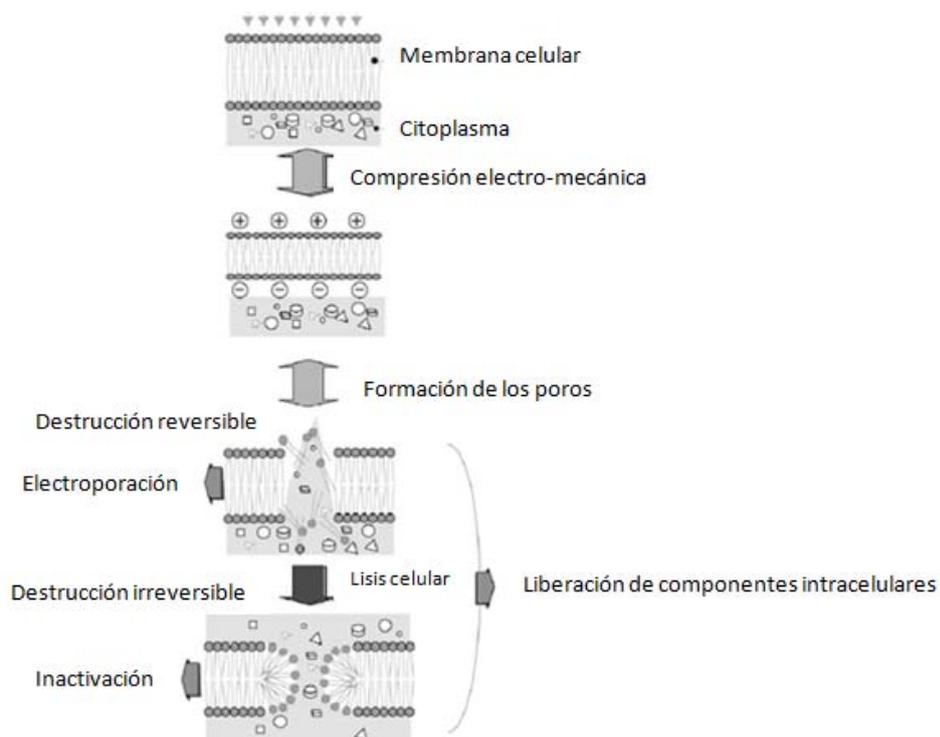


Figura 1: Diagrama esquemático de la permeabilización por PEAV (adaptado de Ohshima y Sato, 2004).

Así, Ohshima y col., aplicaron PEAV para recuperar proteínas recombinantes de *E. coli*, concretamente β -glucosidasa, α -amilasa y celobiohidrolasa (citado en Ohshima y Sato, 2004). Estos autores obtuvieron resultados variables según la proteína, diferencia que oscilaba entre unos rangos de recuperación entre el 26 y el 89 % y una actividad específica de entre 0,5 y 9 veces la obtenida mediante ultrasonidos. Todos los resultados se obtuvieron a la misma intensidad de campo eléctrico 10kV/cm, pero con diferentes cámaras de tratamiento y diferentes soluciones de suspensión (Ohshima y Sato, 2004). Así, se puede afirmar que de forma general y en relación a la salida de componentes intracelulares tras los tratamientos de PEAV:

-A mayor intensidad de tratamiento (mayor intensidad de campo eléctrico y/o mayor duración de los pulsos/tratamiento) mayor permeabilización, mayor inactivación, y mayor salida de componentes intracelulares (Aronsson y col., 2005).

-De la misma manera que la magnitud de la inactivación y la permeabilización son dependientes de la especie microbiana estudiada, también lo es la salida de componentes intracelulares al medio.

Por ejemplo tratamientos capaces de alcanzar niveles similares de inactivación en *E. coli* y en *S. cerevisiae*, resultaron en la salida de un 16,7 % y del 52,3 % del ATP total celular para, *E. coli* y *S. cerevisiae*, respectivamente. (Aronsson y col., 2005). Resultados similares se obtuvieron en relación a la salida de componentes que absorben a 260-280 nm, como las proteínas y los ácidos nucleicos (Goldring, 2015).

2.5. *Staphylococcus aureus*:

Staphylococcus aureus es una bacteria pequeña (tiene aproximadamente entre 0,5 y 1,5 μ m de diámetro) (Public Health Agency of Canada, 2011) y de forma esférica que suele disponerse en parejas, cadenas cortas o racimos similares a los de las uvas, es anaerobia facultativa, gram-positiva, catalasa positiva, carece de flagelos, por tanto es inmóvil y también carece de formas de resistencia esporuladas. Es ubicua y formadora de biofilms, por lo que es difícil de erradicar, y su principal reservorio son las mucosas de los mamíferos.

S. aureus es una bacteria patógena y principalmente protagoniza brotes con síntomas gastrointestinales. No obstante también es capaz de causar infecciones nosocomiales, neumonía, infecciones en heridas, el síndrome del shock tóxico, etc.

Es uno de los patógenos no esporulados más resistentes frente a diferentes agentes como el calor, los ultrasonidos, las altas presiones hidrostáticas y puede sobrevivir largos periodos en medios secos, siendo capaz de crecer a a_w de 0,83 aunque su óptimo sea $>0,99$ (Food and Drug Administration, 2012). Los estafilococos son mesófilos y su crecimiento oscila entre 7°C y $47,8^{\circ}\text{C}$, siendo 35°C la temperatura óptima de crecimiento, pueden multiplicarse a pH de entre 4,5 y 9,3, siendo el óptimo de 7,0-7,5 (Food and Drug Administration, 2012).

En este estudio se ha seleccionado este microorganismo ya que el grupo de investigación de Nuevas Tecnologías de Procesado de los Alimentos posee una amplia experiencia en el trabajo con este microorganismo y por lo tanto dispone de métodos ya desarrollados para llevar a cabo este estudio y los conocimientos de su fisiología necesarios para la correcta interpretación de los resultados obtenidos.

3) JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS:

La tecnología de los PEAV se ha propuesto como una alternativa capaz de inactivar células vegetativas, causando cambios mínimos en las características de los alimentos, en comparación a tratamientos tradicionales. El objetivo de este trabajo fin de grado fue cuantificar y caracterizar las proteínas que resultaron liberadas al medio extracelular tras exponer a células de *Staphylococcus aureus* a tratamientos de PEAV que conducían a diferentes grados de permeabilización y/o inactivación celular. Con ello se pretendió contribuir al conocimiento de los mecanismos celulares implicados en la inactivación y en la supervivencia de los microorganismos de interés en los alimentos frente a esta tecnología.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos parciales:

-La puesta a punto diferentes técnicas de medida de concentración de proteínas y su adaptación para los fines de este estudio.

-La determinación de la proporción de células de *Staphylococcus aureus* electropermeabilizadas e inactivadas en medios de tratamiento de diferente pH y sometidas a tratamientos de PEAV de diferente intensidad.

-La determinación de la cantidad de componentes intracelulares, con especial atención a las proteínas, liberadas al medio tras los diferentes tratamientos de PEAV, y el estudio de la posible relación con los fenómenos de inactivación y reparación del daño subletal.

4) MATERIAL Y MÉTODOS:

4.1. Preparación de medios de tratamiento y crecimiento:

Para este trabajo se utilizaron los siguientes medios:

-A) Medio de crecimiento (pre-cultivo y cultivo): caldo TSB (Tryptic Soy Broth, Oxoid), suplementado con un 0,6% extracto de levadura y que se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante.

-B) Medio de recuperación: agar TSA (Tryptic Soy Agar, Oxoid), suplementado con un 0,6% extracto de levadura y preparado siguiendo las instrucciones del fabricante.

-C) Medio de recuperación selectivo: idéntico al medio B) salvo una adición de un 13% (p/v) de NaCl (Panreac).

-D) Agua de peptona tamponada al 1% (AES).

-E) Medios de tratamiento: disoluciones tampón McIlvaine (citrato-fosfato) (Dawson y col., 1974), de pH 7,0 y 4,0 y ajustados a una conductividad de 2mS/cm con ayuda de un conductivímetro (Ahlborn, Almemo).

-F) Solución de agar técnico al 2% (p/v), que se utilizó para inmovilizar los microorganismos en los portaobjetos, con la finalidad de facilitar el recuento por microscopía (Panreac).

Todos ellos (salvo el medio F) fueron esterilizados durante media hora a 121°C después de su preparación y antes de su uso.

4.2. Cultivo de *Staphylococcus aureus*:

En este estudio se utilizó la cepa CECT 4459 de *S. aureus*, que se mantuvo congelada a -80°C en crioviales. A partir de una placa de TSA en la que se sembró previamente la cepa por agotamiento en estría, se realizó un pre-cultivo en TSB mediante inoculación de una colonia individual. Este pre-cultivo se incubó durante unas 6 horas a 37°C ± (1°C) con agitación. Posteriormente se inocularon 50 µl del pre-cultivo en frascos con TSB (50 ml) y se incubó el cultivo en agitación a 37°C ± (1°C) durante 24 horas, tiempo suficiente para que se obtuviese un cultivo de células en fase estacionaria, que fue el tipo de células que se utilizó para todo este estudio.

4.3. Tratamientos por PEAV:

Se utilizó un equipo de pulsos de caída exponencial que generaba dichos pulsos mediante la descarga de 2 sets de 5 condensadores cada uno, a través de un interruptor (Behlke, HTS 160-500SCR). Los sets de condensadores se cargaban mediante un generador de corriente continua de alto voltaje (FUG, HCK 2500M 35000, Rosenhein, Alemania). El equipo estaba controlado por un ordenador conectado a un generador de funciones (Tektronix, AGF 320, Wilsonville, Oregon, EE. UU.) encargado de enviar el tiempo de funcionamiento al interruptor. La frecuencia utilizada fue de 1 Hz (1 pulso/s), con una anchura de pulso de unos 4 μ s y se trabajó en un rango de entre 18-26kV/cm. El campo eléctrico real y la intensidad en la cámara de tratamiento se midieron con una sonda de alto voltaje y una sonda de intensidad de corriente respectivamente, conectadas al osciloscopio (Tektronix TDS3012B, Wilsonville, EE. UU.). La cámara de tratamiento consistió en un tubo de polietileno cerrado 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.

Previamente al tratamiento, la suspensión microbiana fue centrifugada durante 90 segundos a 14.500 rpm y posteriormente las células se resuspendieron en el tampón de tratamiento. Una vez resuspendidas se introdujeron mediante una jeringuilla hipodérmica estéril en la cámara de tratamiento que posteriormente se sellaba con cinta adhesiva. Tras el tratamiento se extraía la muestra con una jeringuilla estéril y se realizaban las correspondientes diluciones para determinar el número de supervivientes o las diferentes medidas (tinción con yoduro de propidio o salida de componentes intracelulares).

4.4. Recuperación, recuento en placa y parámetros de resistencia:

La recuperación de las células tratadas con PEAV comenzaba con la extracción de la cámara con aguja hipodérmica, tras lo cual se realizaban sucesivas diluciones decimales en agua de peptona. A partir de dichas soluciones se sembró en masa en placas de TSA y TSA-NaCl que se incubaron a 37°C durante 24 y 72 horas, respectivamente. La concentración de NaCl escogida corresponde a la concentración máxima no inhibitoria para esta cepa y el objetivo de su adición era impedir la reparación de los daños presentes en todas aquellas que han sido electroporadas (Cebrián y col., 2015).

El recuento del número de Unidades Formadoras de Colinas se realizó con un contador de colonias por análisis de imagen diseñado en el laboratorio y desarrollado por el servicio de Instrumentación Científica de la Universidad de Zaragoza.

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. Cada determinación experimental de supervivencia a los PEAV se realizó al menos por triplicado en diferentes días de trabajo. Los datos en las gráficas corresponden a la media y a la desviación estándar.

Dada la forma cóncava de las gráficas de supervivencia, se optó por utilizar un modelo basado en la distribución de Weibull, según recomiendan Álvarez y col.(2003b), siendo la ecuación del modelo utilizado la que se indica a continuación, donde $S(t)$ es la fracción de supervivientes y t , el tiempo de tratamiento:

$$\text{Log}_{10}S(t) = -\left(\frac{t}{\delta}\right)^{\rho}$$

Este modelo permite estimar la inactivación microbiana a partir de dos parámetros: el parámetro δ (expresado en microsegundos o número de pulsos) que está relacionado con la intensidad del tratamiento, y el parámetro ρ , cuyo valor depende de la forma de la gráfica de supervivencia. Para modelizar los datos experimentales se utilizó el programa GraphPadPrism 5.00 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, EE. UU.).

4.5. Tinción con yoduro de propidio:

Se empleó la tinción fluorescente mediante yoduro de propidio (IP; Sigma-Aldrich, 287075) para cuantificar la permeabilización de la membrana causada por los PEAV. Este colorante es un marcador que se utiliza frecuentemente para determinar y cuantificar la aparición de poros en la membrana, pues cuando está intacta no puede entrar al citoplasma celular. Una vez dentro se produce una intensa fluorescencia de color rojo tras su interacción con los ácidos nucleicos (Cebrián y col., 2015).

Se trabajó con una solución de yoduro de propidio de 1mg/ml en agua. El protocolo de tinción fue el siguiente: se centrifugaron muestras de 1 ml del cultivo a 14.500 rpm durante 90 segundos y las células se resuspendieron en el tampón de tratamiento

correspondiente (de pH 4,0 o 7,0) con lo que la concentración celular era próxima a 10^8 células/ml.

A cada ml de esta suspensión se le agregaron 2 μ l de la solución de IP (llegando a una concentración final de 0,002 mg/ml) antes de ser introducida en la cámara de tratamiento de PEAV. Experimentos previos demostraron que la presencia de IP no afecta a la resistencia microbiana a los pulsos (Cebrián y col., 2015).

Tras los tratamientos, las muestras se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad durante 10 minutos. Tras la incubación una fracción de la muestra se situaba en un portaobjetos con agar al 2% (p/v) para evitar el movimiento de las células por movimiento del medio líquido y facilitar el examen microscópico. El porcentaje de células permeabilizadas se estimó mediante examen microscópico usando un microscopio Nikon Eclipse E4000 (Nippon, Kogaku KK, Japón) equipado con lentes de contraste de fases y una unidad de epifluorescencia. En todos los casos se usó un objetivo de 100 aumentos con aceite de inmersión. Los recuentos celulares se realizaron en múltiples campos con alta concentración celular (más de 40-50 células).

El porcentaje de células permeabilizadas se calculó comparando el número total de células con el de aquellas que mostraban fluorescencia y por ende habían sido permeabilizadas frente al IP (Cebrián, 2009).

Los datos se normalizaron restando el porcentaje de células control que mostraron fluorescencia, que siempre fue menor del 2,5%.

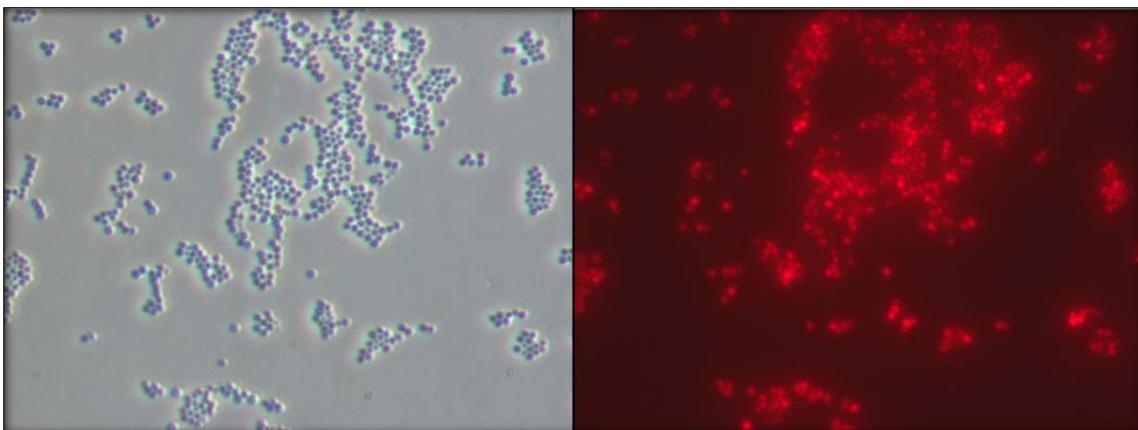


Figura 2: Células de *Staphylococcus aureus* tratadas en presencia de IP a 20 kV/cm durante 25 pulsos, observadas mediante microscopía de contraste de fases (izda.) y microscopía de fluorescencia (derecha).

4.6. Cuantificación y caracterización de las proteínas liberadas:

4.6.1. Técnicas de BCA, Bradford y espectrofotometría UV:

Fundamento de la técnica del ácido bincinconínico(BCA):

Es un método altamente sensible que combina la reacción de las proteínas con Cu^{2+} en un medio alcalino (obteniéndose Cu^+ , reacción de Biuret), y la adición de un reactivo altamente selectivo y sensible denominado ácido bincinconínico, para la detección del Cu^+ formado. (Goldring, 2015).

El producto de la interacción de dos moléculas de BCA con el ión Cu^+ presenta un color púrpura, es soluble en agua y tiene una fuerte ABS a 562 nm, esto permite la cuantificación espectrofotométrica de proteínas en solución acuosa.

Fundamento de la técnica de Bradford:

Este método se basa en la unión del colorante azul brillante de Coomassie G-250 a las proteínas, este colorante existe en tres formas, catiónico, (rojo), neutro (verde), y aniónico (azul). Bajo condiciones ácidas, el colorante se encuentra predominantemente en la forma doble protonada catiónica con absorbancia máxima a 470 nm. Sin embargo, cuando el colorante se une a proteínas se convierte en una forma estable azul no protonada con una absorbancia máxima a 595nm (Goldring, 2015).

Fundamento de la técnica de espectrofotometría UV (280 nm):

El uso de la absorbancia en la región ultravioleta para medir la concentración de proteína es posiblemente el método más simple y rápido para determinar la concentración de proteínas, aunque puede producir resultados poco exactos, sobre todo cuando se tiene una mezcla de proteínas y ácidos nucleicos.

La cuantificación a 280 nm depende de la presencia de los aminoácidos aromáticos, principalmente la tirosina (Tyr) y el triptófano (Trp).

Algunas ventajas de emplearla son: a) la muestra no se destruye o altera durante la determinación; b) no utiliza reactivos adicionales; y c) no requiere esperar tiempos de incubación.

4.6.2. Tiempo de incubación y determinación del rango lineal:

Se utilizó un patrón de BSA (Bovine Serum Albumine o Albúmina Sérica Bovina), como proteína con la que realizar la puesta a punto de la metodología que, posteriormente, nos permitiese realizar una medida de la salida de proteínas de las células de *Staphylococcus aureus* tratadas por PEAV.

A partir del patrón de BSA de 2mg/ml se realizaron diluciones hasta valores de 0,01 mg/ml en tampón McIlvaine de pH 7,0 que se dispusieron en placas “microtiter” de 96 pocillos. Posteriormente se añadieron los diferentes reactivos siguiendo las instrucciones del fabricante.

Influencia del tiempo de incubación:

En el caso del método de Bradford las muestras fueron incubadas durante diferentes intervalos de tiempo entre 5 y 30 minutos a temperatura ambiente. Por su parte en el caso del BCA las muestras se incubaron a 37°C y se alargaron los intervalos de incubación hasta una hora.

En el caso del método del BCA, como puede observarse en la figura 3, prolongar el tiempo de incubación resultó en mayores intensidades de absorbancia. El incremento de 30 a 60 minutos de incubación se tradujo en un ligero incremento en el rango lineal de cuantificación: por el contrario también se observó una mayor variabilidad en los valores obtenidos para la misma concentración de BCA. Por ello se fijó en 30 minutos en tiempo de incubación.

En el caso del método de Bradford, y como puede observarse en la figura 3, la influencia del tiempo de incubación en los valores de absorbancia, es inexistente a partir de los 5 minutos, por lo que de querer cuantificar proteínas con este método podríamos usar cualquiera de los tres tiempos en los que hemos realizado las curvas de calibración, es decir podríamos medir tras 5,15 o 30 minutos indistintamente.

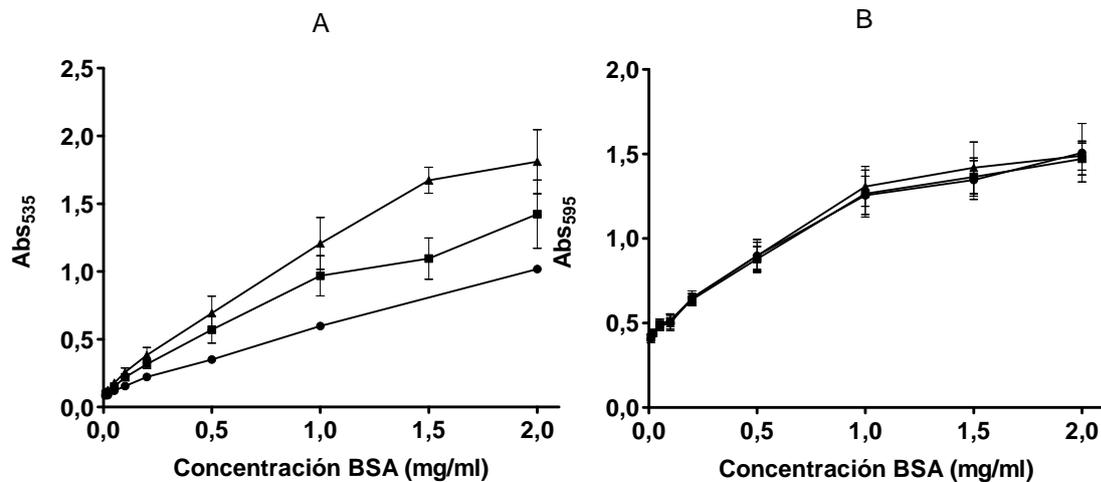


Figura 3: **A)** relación entre la concentración de BSA y la absorbancia a 535 nm determinada según el método BCA. **B)** relación entre la concentración de BSA y la absorbancia a 595 nm determinada según el método Bradford.

Tiempo de incubación del método BCA: 15 minutos (●), 30 minutos (■), 60 minutos (▲).

Tiempo de incubación del método Bradford: 5 minutos (●), 15 minutos (■), 30 minutos (▲).

Determinación de los rangos de cuantificación:

Método BCA:

Una vez fijado el tiempo de incubación (30 minutos a 37°C) se procedió a determinar el rango lineal en el que poder extrapolar para determinar la concentración de proteína en el medio de tratamiento.

Según el manual proporcionado por el fabricante, esta técnica tiene un amplio rango de trabajo (20-2000 µg/ml o 0,02 y 2 mg/ml), aunque el método BCA no es un método de punto final, ya que el color final continua desarrollándose (extraído de: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225>) el ratio de desarrollo de color es lo suficientemente lento para permitir que se ensayen un largo número de muestras juntas.

El rango lineal se situó entre 0,02 y 0,5 mg/ml, y, a partir de la gráfica que se presenta en la figura 4, se obtuvo la siguiente ecuación a partir de la cual determinar la concentración de proteína en el medio:

$$y = 0,959x + 0,103$$

Donde y es la Absorbancia a 535 nm y x corresponde a la concentración de BSA en mg/ml. Esta ecuación tiene índice de correlación $r^2 = 0,990$.

Método Bradford:

Como se ha revelado anteriormente el método Bradford no mostraba diferencias significativas entre el tiempo mínimo de incubación de 5 minutos y el máximo de 30, por lo que podíamos realizar la lectura de ABS en la totalidad de dicho intervalo.

Según el manual tiene un rango de trabajo entre (0,125 mg/ml y 1 mg/ml) si se usa BSA para hacer la curva patrón (extraído de: <http://www.bio-rad.com/es-es/product/quick-start-bradford-protein-assay>).

Se procedió de forma similar que para el método BCA y se determinó que el rango lineal se situaba entre 0,02 y 1 mg/ml, como puede observarse en la figura 4. Además la concentración de proteína en el medio se podía calcular a partir de la absorbancia desarrollada en los pocillos tras 5 minutos de incubación según la siguiente ecuación:

$$y = 0,849x + 0,432$$

Donde y es la absorbancia a 595 nm y x corresponde a la concentración de BSA en mg/ml. Esta ecuación tiene índice de correlación, $r^2 = 0,989$.

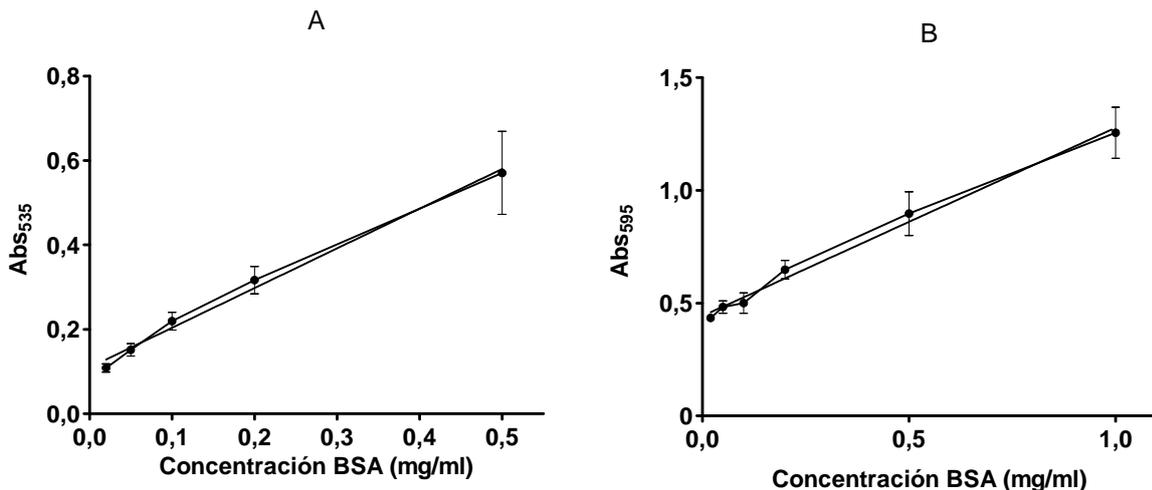


Figura 4:A), relación lineal entre la concentración de BSA y la absorbancia a 535 nm determinada según el método BCA. Tiempo de incubación del método: 30 minutos. **B)**, relación lineal entre la concentración de BSA y la absorbancia a 595 nm determinada según el método Bradford. Tiempo de incubación del método: 5 minutos

4.7. Medida de la salida de componentes intracelulares:

Para llevar a cabo la determinación de la salida de componentes intracelulares, las células de *S. aureus* se centrifugaban tras el tratamiento, se descartaba el depósito (células), y se reservaba el sobrenadante para su uso posterior. Fue necesario no obstante, realizar unas comprobaciones previas para establecer las condiciones de trabajo.

4.7.1. Número de lavados y concentración celular:

En primer lugar y debido a que el medio de crecimiento contenía una gran cantidad de hidrolizado de proteínas que podría enmascarar nuestras mediciones de proteínas, se realizaron ensayos utilizando uno y dos lavados de las células microbianas (pellets) de manera previa al tratamiento con PEAV.

De estos ensayos se concluyó la necesidad de efectuar al menos dos lavados. Además, y para evitar la interferencia que podrían causar las células tratadas, el sobrenadante era filtrado a través de un filtro de 0,22 μm antes de proceder a la medida espectrofotométrica y de los ensayos de los métodos de BCA y Bradford.

Por otra parte, también se realizaron una serie de ensayos trabajando con suspensiones celulares concentradas $\times 2$, $\times 4$ y $\times 8$ veces, en relación a la concentración de los cultivos en fase estacionaria para determinar qué condiciones, de las ensayadas, eran las más adecuadas para obtener señales analíticas suficientes y comparables. Dado que previamente se había determinado que concentrar hasta 10 veces los cultivos microbianos no tenía efectos apreciables en la resistencia microbiana a los PEAV y dado que la señal analítica fue mayor tras tratar suspensiones concentradas 8 veces, seleccionamos la concentración de $\times 8$ para el resto de ensayos de extracción proteica.

4.7.2. Influencia del tiempo post-tratamiento:

Posteriormente se evaluó la influencia del tiempo de incubación post-tratamiento en la concentración de proteínas liberadas al medio extracelular. Esto nos permitió determinar si la salida se realizaba gradualmente a través de los poros generados por el tratamiento PEAV o si por el contrario, se producía súbitamente tras la aparición de los poros y nos permitiría estandarizar el protocolo de medida para poder establecer comparaciones significativas.

La señal analítica de los tres métodos incrementó con el tiempo de incubación post-tratamiento. No obstante, mientras que para las medidas de UV el máximo se alcanzó tras 5 minutos de tratamiento, para las de BCA y Bradford este se alcanzó tras 15 minutos. Por ello el tiempo de incubación post-tratamiento quedó fijado en 15 minutos.

A la vista de todo lo descrito anteriormente el protocolo final de determinación de la salida de componentes fue el siguiente: las suspensiones de *S. aureus* se concentraron 8 veces por centrifugación y el pellet resultante se lavó dos veces con tampón de tratamiento. Tras los tratamientos la suspensión se incubó durante 15 minutos en el mismo medio de tratamiento. Transcurridos esos 15 minutos la suspensión se volvió a centrifugar, se descartó el depósito y se reservó el sobrenadante, que se filtró con filtros para jeringuilla de 0,22 μ m. Este sobrenadante fue el que se utilizó para las medidas de UV, y los ensayos de BCA y Bradford que se realizaron según las instrucciones del fabricante y cuyo tiempo de incubación fue de 30 minutos para BCA y 5 minutos para Bradford.

Todas las medidas de concentración de proteína en el sobrenadante y de absorbancia a 280 nm se realizaron al menos por duplicado y a su vez, a partir de al menos dos suspensiones microbianas obtenidas en días de trabajo diferentes.

5) RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

5.1. Comparación entre la tinción con IP y la sensibilización al NaCl:

Inicialmente se realizó una comparación entre el porcentaje de células permeabilizadas al IP, y el porcentaje de células incapaces de crecer en TSA-NaCl. Para ello, se sometió a las células de *S. aureus* a tratamientos de PEAV de diferente intensidad (campo eléctrico de 18 a 26 kV/cm y 20-400 μ s de duración), a pH 7,0 y 4,0. En estas muestras, se evaluó el porcentaje de células permeabilizadas al IP y el porcentaje de células incapaces de crecer en TSA-NaCl, y se compararon ambos resultados (Figura 5). Como puede observarse, existió una correlación entre ambos parámetros ($r^2=0,9005$), por lo que el uso de NaCl como marcador de la electroporación puede considerarse equiparable al uso de IP, como ya demostraron los resultados de Cebrián y col. (2015). Por lo tanto, estos resultados indicaron que el número de células tratadas por PEAV y capaces de crecer en un medio con NaCl corresponde al número de células cuya membrana no ha sido permeabilizada por los PEAV.

Además, el método del recuento en placa (en TSA-NaCl) frente al yoduro de propidio permite la posibilidad de estudiar tratamientos con porcentajes de permeabilización muy elevada y compararlos, ya que para realizar recuentos más allá de las dos unidades logarítmicas (>99% de células permeabilizadas), con microscopia deberían realizarse ingentes cantidades de capturas y recuentos.

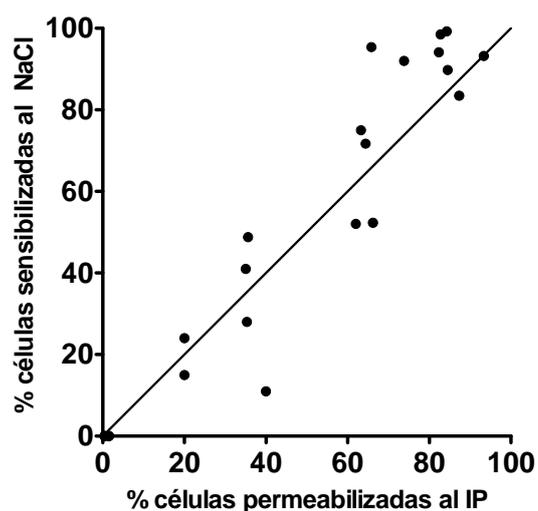


Figura 5: Comparación del porcentaje de células permeabilizadas determinado mediante tinción por Ioduro de propidio con el porcentaje de células sensibilizadas al NaCl (13 %).

5.2. Inactivación de *S. aureus* por PEAV en medios de pH 7,0:

En primer lugar se determinó la inactivación de *S. aureus* en tampón de pH 7,0 y a dos niveles de intensidad de campo eléctrico (18 y 26 kV/cm). En la figura 6 se muestran las gráficas de supervivencia obtenidas en dos medios de recuperación (TSA y TSA-NaCl). Cada uno de estos medios indicaba la cantidad de células inactivadas (TSA) y permeabilizadas (TSA-NaCl). Como ya se ha demostrado anteriormente (Figura 5), el uso de NaCl en el medio de recuperación puede considerarse equivalente al uso de IP como sistema para cuantificar la permeabilización de la membrana celular de *S. aureus* por PEAV (Cebrián y col., 2015). Según se describe en material y métodos, las gráficas fueron modelizadas utilizando un modelo basado en la distribución de Weibull (tabla 1). En este modelo el parámetro δ indica el tiempo (μ s) necesario para lograr el primer ciclo de inactivación (TSA) o permeabilización (TSA-NaCl), mientras que el valor de ρ indica la forma de la gráfica de inactivación, si es igual a 1 es lineal, si es menor de uno es cóncava y si es mayor de 1, convexa.

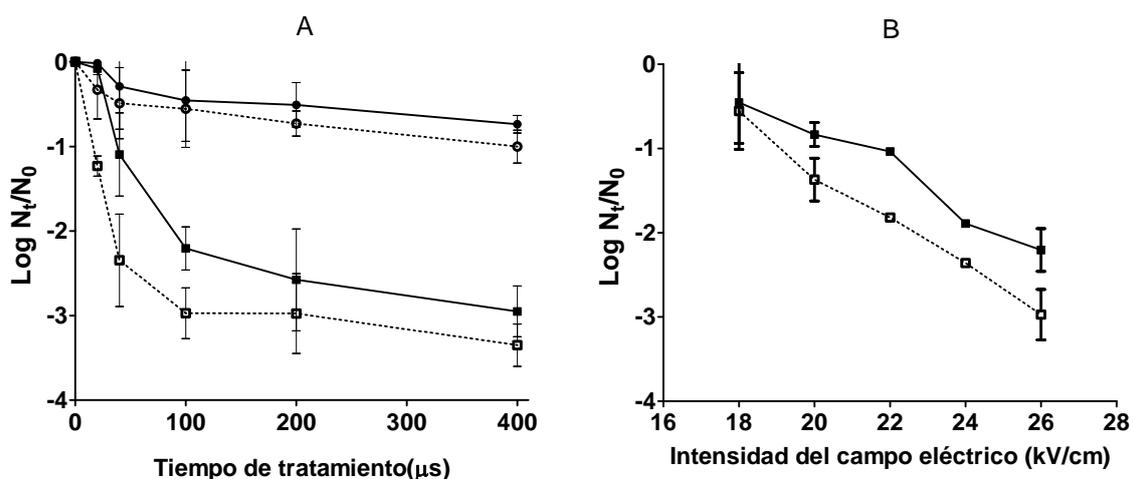


Figura 6: Inactivación y permeabilización celular de *S. aureus* frente a los PEAV en medio de pH 7,0.

A: Gráficas de supervivencia a 26 kV/cm (■,□) y a 18 kV/cm (●,○), recuperando las células en TSA (símbolos rellenos, ■,●) y en TSA-NaCl (símbolos huecos □,○).

B: Influencia del campo eléctrico (18-26 kV/cm; 100 μ s) en la supervivencia (TSA, ■) y en la permeabilización (TSA-NaCl, □).

Como puede deducirse de la figura 6 y de la tabla 1, tanto el grado de inactivación como el de permeabilización fue mayor a mayor intensidad de campo eléctrico y cuanto más largos fueron los tratamientos aplicados, hasta 100-200 μ s aproximadamente.

Además, se puede observar que la proporción de células subletalmente dañadas (calculada como la diferencia entre el número de células recuperadas en TSA y en TSA-NaCl) fue menor tras los tratamientos con el campo eléctrico más bajo estudiado. La proporción de células subletalmente dañadas tendía a disminuir también conforme más largos eran los tratamientos aplicados, efecto que se manifiesta en el caso de los tratamientos a 26 kV/cm. Además, se puede observar que mientras en todos los tratamientos a 18 kV/cm prácticamente todas las células que resultaban permeabilizadas eran inactivadas, en los tratamientos a 26 kV/cm de duración igual o menos a 100 μ s se observaba alrededor de una unidad logarítmica de diferencia entre los valores de permeabilización e inactivación, de manera que no todas las células que eran permeabilizadas se inactivaban, sino que, por el contrario, una proporción de las células era capaz de reparar sus daños y sobrevivir.

Tabla 1: Parámetros de resistencia (ecuación de Weibull) a los PEAV de *S. aureus* en medios de pH 7,0. Los números entre paréntesis corresponden al error estándar.

Medio recuperación	Campo eléctrico	δ (μ s)	ρ
TSA	18 kV/cm	690,8 (369,7)	0,5181(0,210)
	26 kV/cm	33,61 (12,20)	0,4740(0,084)
TSA NaCl	18 kV/cm	431,6 (175,6)	0,3554 (0,119)
	26 kV/cm	1,796 (1,520)	0,2334 (0,043)

5.3. Inactivación de *S. aureus* por PEAV en medios de pH 4,0:

De forma similar a lo descrito para los medios de pH 7,0 se obtuvieron las gráficas de supervivencia de *S. aureus* en medio de pH 4,0, se modelizaron dichas gráficas de supervivencia y se estudió la influencia del campo eléctrico (Figura 7 y Tabla 2). Como se puede deducir de las figuras y la tabla, de nuevo, mayores campos eléctricos y tiempos de tratamiento, hasta 200 μ s, aproximadamente, resultaron en un incremento en la proporción de células permeabilizadas e inactivadas.

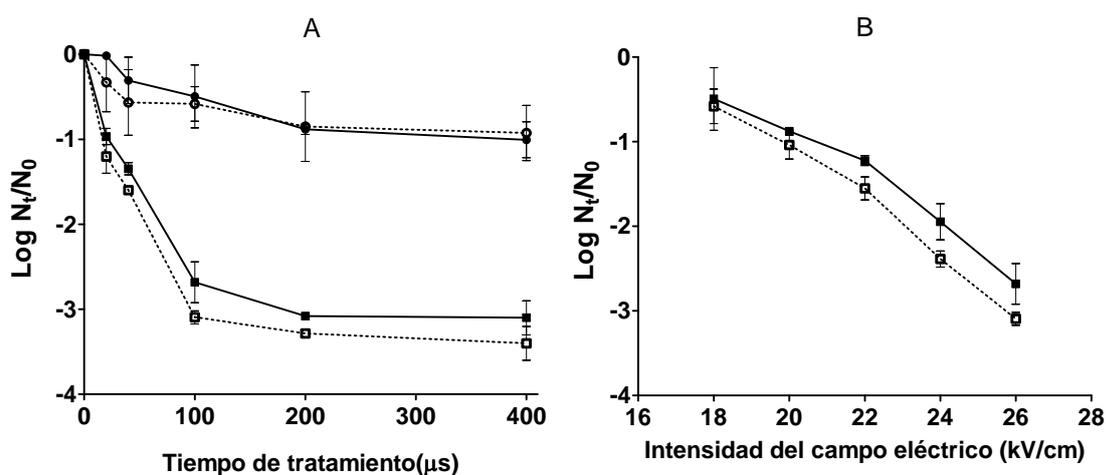


Figura 7 : Inactivación y permeabilización celular de *S. aureus* frente a los PEAV en medio de pH 4,0.**A):**Gráficas de supervivencia a 26 kV/cm (■,□) y a 18 kV/cm (●,○), recuperando las células en TSA(símbolos rellenos, ■,●)y en TSA-NaCl (símbolos huecos, □,○).
B): Influencia del campo eléctrico (18-26 kV/cm; 100 μ s) en la supervivencia (TSA, ■) y en la permeabilización (TSA-NaCl, □).

No obstante, al comparar estos datos con los obtenidos a pH 7,0se puede observar que la diferencia entre el número de células permeabilizadas y el número de células inactivadas fue menor a pH 4,0 que a pH 7,0. Así, a pH 4,0, a 18 kV/cm fueron prácticamente el mismo valor y a 26 kV/cm tan solo se observaban aproximadamente 0,25 unidades logarítmicas de diferencia, mientras que a pH 7,0 y 26 kV/cm se observaba hasta un ciclo logarítmico de diferencia. Es más, comparando los valores δ calculados en medios de pH 7,0 y 4,0 y en medio de recuperación con y sin sal se comprobó que, por una parte, en TSA sin NaCl los valores δ calculados cuando las células se trataban a pH 4,0 eran inferiores que cuando se trataban a pH 7,0, lo que indica que el número de células de *S. aureus* inactivadas era mayor en medios de pH ácido.

Por el contrario, esto no se observaba si se comparan los valores δ calculados cuando las células se recuperan en TSA con NaCl. En otras palabras, los resultados obtenidos indican que a pH 4,0 se permeabilizaban las mismas o incluso menos células, pero sin embargo finalmente acababan siendo inactivadas un mayor número de ellas, o lo que es lo mismo, que tras ser tratadas a pH 4,0 hubo una menor proporción de células dañadas subletalmente. Las posibles causas de este fenómeno serán discutidas más adelante.

Tabla 2: Parámetros de resistencia (Weibull) a los PEAV de *S. aureus* en medios de pH 4,0. Los números entre paréntesis corresponden al error estándar.

Medio recuperación	Campo eléctrico	δ (μ s)	<i>P</i>
TSA	18 kV/cm	345,8 (55,44)	0,5835 (0,122)
	26 kV/cm	9,550 (3,941)	0,3315 (0,044)
TSA NaCl	18 kV/cm	462,4 (241,5)	0,2951 (0,112)
	26 kV/cm	4,936 (2,460)	0,3003 (0,040)

5.4. Salida de componentes intracelulares tras los tratamientos de PEAV en medios de pH 7,0:

Una vez estudiada la influencia de los diferentes parámetros (campo eléctrico, número de pulsos y pH de tratamiento) en la supervivencia de *S. aureus* a los PEAV se procedió a determinar la cantidad de componentes intracelulares liberados al medio (con especial atención a las proteínas) tras dichos tratamientos. Los resultados de las concentraciones de proteína estimadas por los métodos de Bradford, BCA, y la absorbancia a 280 nm en los sobrenadantes de células de *S. aureus* tratadas por PEAV se muestran en la figura 8.

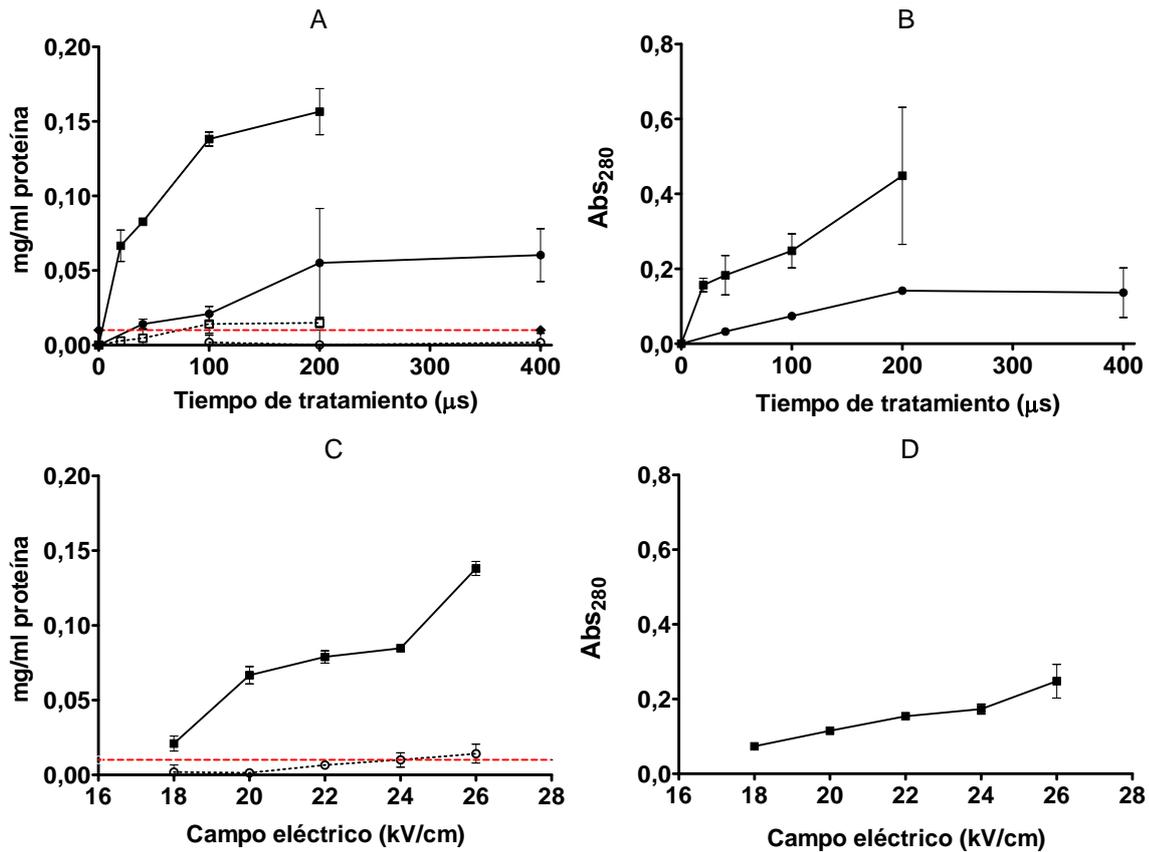


Figura 8: Salida de componentes al medio extracelular tras la exposición de células de *S. aureus* a tratamientos de PEAV en medio de pH 7,0.

A: Influencia del tiempo de tratamiento a 26 kV/cm (■, □) y 18 kV/cm (●, ○) en la salida de proteínas medida mediante el método BCA (símbolos rellenos) y método Bradford (símbolos huecos). La línea roja discontinua indica el límite de detección de las técnicas.

B: Influencia del tiempo de tratamiento a 26 kV/cm (■) y 18 kV/cm (●) en la salida de componentes capaces de absorber a 280 nm.

C: Influencia del campo eléctrico (100 μ s) en la salida de proteínas medida mediante método BCA (■) y método Bradford (○).

D: Influencia del campo eléctrico (100 μ s) en la salida de componentes capaces de absorber a 280 nm.

Como se puede observar en la figura 8, en general, se produjo un aumento de la concentración de componentes en el medio extracelular al aumentar la intensidad del campo eléctrico aplicado, y el tiempo de tratamiento. Como se ha señalado con anterioridad, a mayor intensidad de campo eléctrico y mayor tiempo de tratamiento se produjo una mayor permeabilización de la población microbiana y por ende es lógico que, como indica la figura 8, se obtuviese una mayor salida de componentes.

Por otra parte, como se ha descrito en material y métodos, la espectrofotometría UV es un método poco útil para la medida de la concentración proteica en muestras en las que hay mezclas de proteínas y todavía menos en aquellos en los que la mezcla también incluye ácidos nucleicos. Es por eso que esta técnica resultó casi más útil como indicador general de permeabilización que de salida de proteínas, pues muchos ácidos nucleicos, como el ATP, poseen un peso molecular relativamente bajo.

Por otra parte, la técnica de Bradford, a pesar de presentar diferentes ventajas sobre la del BCA (especialmente a nivel metodológico), tiene su límite inferior de detección entre los 3000 y 5000 Daltons (extraído de <http://www.bio-rad.com/es-es/product/quick-start-bradford-protein-assay>), por lo que no nos permitió cuantificar la salida de péptidos y/o proteínas de menor peso molecular.

Estas premisas nos permitieron profundizar algo más en el análisis de los resultados obtenidos. Así, la baja señal analítica obtenida en los ensayos con el método de Bradford, comparada con los valores obtenidos mediante BCA sugirió que el tamaño de proteína que estaba saliendo del citoplasma de *S. aureus* sería bajo, mayoritariamente por debajo de esos 3000-5000 Da.

Respecto a las tendencias de las gráficas de BCA y de espectrofotometría UV fueron similares, lo que sugiere que tanto péptidos/aminoácidos como ácidos nucleicos presentarían una cinética de salida similar

5.5. Salida de componentes intracelulares tras los tratamientos de PEAV en medios de pH 4,0:

Los ensayos realizados para evaluar la salida de componentes de las células de *S. aureus* a pH 7,0 se repitieron de igual forma cuando las células se trataron a pH 4,0. Las conclusiones derivadas de la figura 9 son similares a las descritas anteriormente para las células tratadas a pH 7,0.

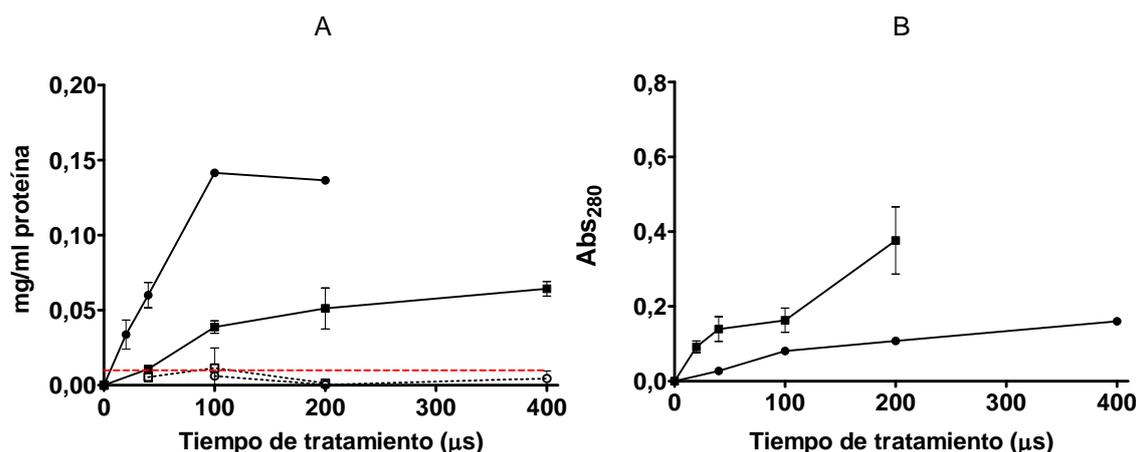


Figura 9: Salida de componentes al medio extracelular tras la exposición de células de *S. aureus* a tratamientos de PEAV en medio de pH 4,0.

A: Influencia del tiempo de tratamiento a 26 kV/cm (■, □) y 18 kV/cm (●, ○) en la salida de proteínas medida mediante el método BCA (símbolos rellenos) y método Bradford (símbolos huecos). La línea roja discontinua indica el límite de detección de las técnicas.

B: Influencia del tiempo de tratamiento a 26 kV/cm (■) y 18 kV/cm (●) en la salida de componentes capaces de absorber a 280 nm.

5.6. Relación entre la salida de componentes y la capacidad de reparación del daño subletal:

El estudio de la salida de componentes podría resultar interesante para tratar de explicar algunos fenómenos relacionados con la inactivación por PEAV. Por ejemplo, las causas de que tras tratamientos que resultan en la permeabilización del mismo número de células, en unos casos éstas sean capaces de reparar sus membranas y sobrevivir a dicho tratamiento y en otros no. Por ello a continuación se presentan una serie de gráficas comparativas en relación a dos escenarios en los que ocurre el fenómeno descrito anteriormente.

En primer lugar en la figura 10 se comparan los porcentajes de inactivación y permeabilización de dos tratamientos a pH 7,0, uno de 18kV/cm 400 μ s y otro de 26kV/cm 20 μ s así como los resultados obtenidos en relación a la salida de componentes como consecuencia de cada uno de ellos.

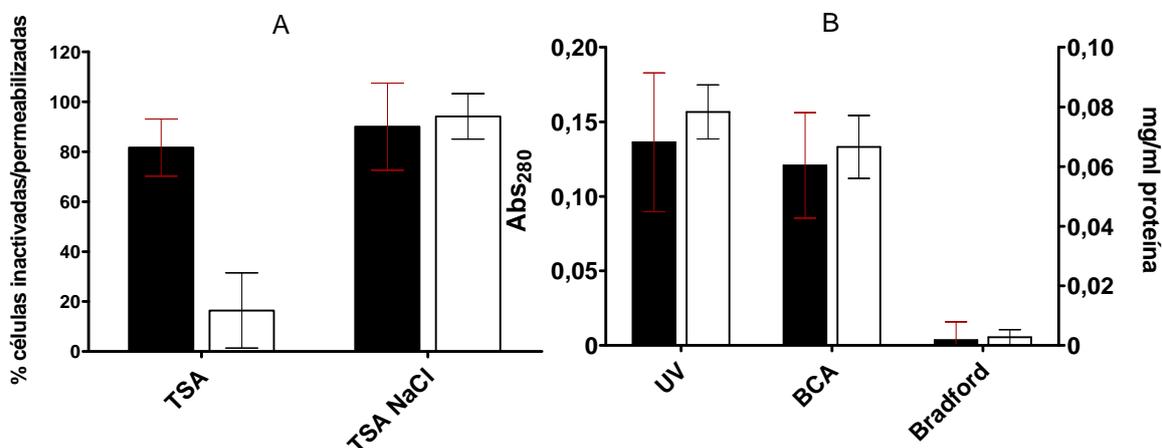


Figura 10: A) Comparación de la inactivación y permeabilización producida por los tratamientos a pH 7,0 y a 18kV/cm/400 μ s (barras negras) y 26kV/cm 20 μ s (barras blancas). B) Salida de componentes/proteínas al medio extracelular medida mediante absorbancia UV a 280 nm, BCA y Bradford tras esos mismos tratamientos.

Como se puede observar en la figura 10, el tratamiento de 18 kV/cm/400 μ s tuvo un poder inactivante mucho mayor que el de 26kV/cm 20 μ s pero, sin embargo no hubo diferencias entre ambos tratamientos en relación a la población que son capaces de permeabilizar. Así, ambos tratamientos condujeron a la permeabilización de las membranas de aproximadamente el 90 % de las células pero mientras que tan sólo el 10% de esas células resultaban inactivadas tras el tratamiento de 20 μ s a 26kV/cm, un 80% de esas células resultaban inactivadas en el tratamiento de 400 μ s a 18kV/cm. Por otra parte, como demuestra la figura 10B) ambos tratamientos produjeron una salida de componentes intracelulares similar. Estos resultados indicarían que una mayor salida de componentes intracelulares tras el tratamiento de 400 μ s a 18kV/cm no fue la causa de la menor capacidad de las células para reparar sus membranas.

Por otra parte hay otro escenario en el que se observa un fenómeno similar. Este es al comparar la permeabilización e inactivación de las células de *S. aureus* tras tratamientos a 26 kV/cm y tiempos inferiores a 100 μ s llevados a cabo en los dos pH estudiados, 7,0 y 4,0

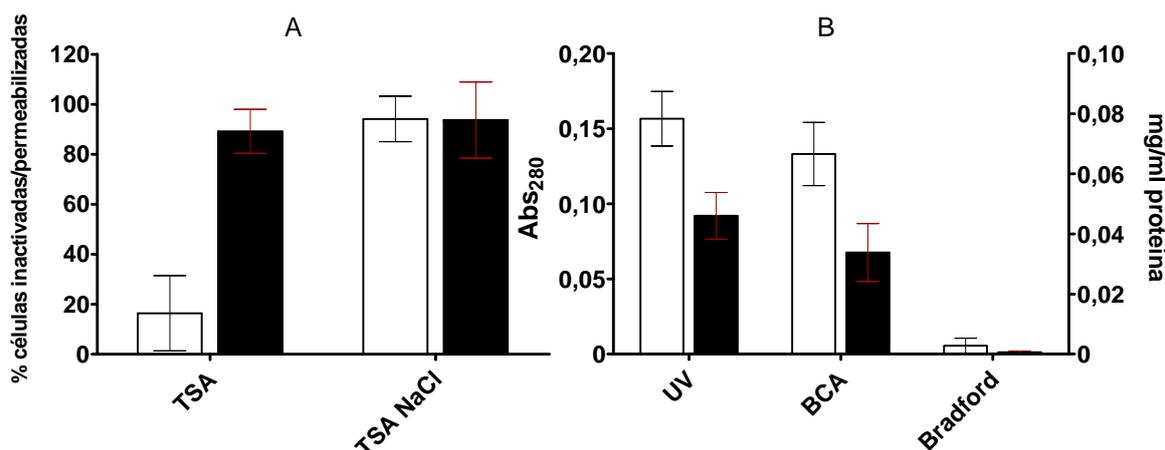


Figura 11:A) Comparación de la inactivación y permeabilización producida con el tratamiento de 26kV/cm 20 μ s a pH 7,0 (barras blancas) y a pH 4,0 (barras negras).

B) Salida de componentes/proteínas al medio extracelular medida mediante BCA, Bradford y ABS UV a 280 nm a pH 7,0 (barras blancas) y a pH 4,0 (barras negras).

Como se puede observar en la figura 11, tampoco en este caso la menor capacidad de las células permeabilizadas a pH 4,0 (en comparación con las de pH 7,0) para reparar los daños y sobrevivir al tratamiento fue acompañada de una mayor salida de componentes intracelulares. Es más, como se puede observar en la figura 11 B, tras un tratamiento de 20 μ s a 26 kV/cm hubo incluso una menor salida de componentes proteicos e intracelulares a pH 4,0 que a pH 7,0.

De los resultados obtenidos se puede concluir que la mayor salida de componentes intracelulares (proteínas y componentes capaces de absorber a 280 nm) no fue la causa de las diferencias en capacidad de reparación del daño observadas en los ejemplos estudiados y que conduce a las diferencias en resistencia a los PEAV observadas en *S. aureus* dependiendo de los parámetros y pH del medio de tratamiento. En el caso de las células tratadas en medio de pH ácido, el mayor nivel de inactivación observado pudo ser debido a la acidificación del citoplasma que se produciría como consecuencia de la permeabilización, lo que supondría una alteración de la homeostasis celular y podría dificultar la reparación de las membranas celulares. Más complicado resulta plantear una hipótesis acerca de las causas que hacen que tratamientos más largos a menores voltajes resulten más letales que otros más cortos a voltajes más elevados (siempre comparando tratamientos que producen el mismo nivel de electroporación). Tal vez los poros generados por los PEAV se consolidarían con tratamientos más largos, lo que podría dificultar su reparación. Serán necesarios nuevos estudios para clarificar estos puntos.

6) CONCLUSIONES:

Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen al conocimiento fundamental del modo de acción de los PEAV sobre las células bacterianas. Se pueden extraer las siguientes conclusiones parciales:

- Tanto la inactivación como la permeabilización de las células de *S. aureus* por los PEAV aumentan a mayor intensidad de campo eléctrico y a mayor duración del tratamiento-hasta los 100-200 μ s-.
- La diferencia entre el número de células permeabilizadas e inactivadas (proporción de células dañadas subletalmente) es mayor cuanto mayor es el campo eléctrico - siempre que se comparen tiempos de tratamiento inferiores a 100 μ s-.
- La acidificación del medio de tratamiento resulta en la inactivación de un mayor número de células. Sin embargo, no provoca un aumento en el número de células permeabilizadas.
- Mayores intensidades de tratamiento conducen a un incremento en la cantidad de componentes intracelulares liberados al medio.
- La comparación de los resultados obtenidos mediante las técnicas del BCA y Bradford indica que el tamaño de la mayor parte de las proteínas liberadas al medio tras los tratamientos por PEAV está mayoritariamente por debajo de los 3000-5000 Dalton.
- No existe una correlación entre la proporción de células dañadas subletalmente y la cantidad de material intracelular (proteínas y componentes capaces de absorber a 280 nm) liberado al medio.

6) CONCLUSIONS:

The results obtained in this work help to understand the fundamentals of PEF mode of action on bacterial cells. The following conclusions can be drawn:

- Results obtained demonstrate that both the inactivation and the permeabilization of *S. aureus* cells caused by PEF increases as the electric field strength rises, so it does with the duration of the treatment, up to 100-200 μ s.
- The difference between the number of permeabilized and inactivated cells (proportion of sublethally damaged cells) is bigger as the electric field strength rises –if treatments of less than 100 μ s are compared-.
- Acidification of the treatment medium results in an increase in the number of inactivated cells, but it does not cause an increase in the number of permeabilized cells.
- Treatments of higher intensity lead to an increase in the amount of intracellular compounds released to the medium.
- Comparing results obtained using the BCA and Bradford techniques indicates that the size of most of the proteins released to the medium after the PEF treatments assayed would be below the range of 3000-5000 Dalton.
- No relation between the proportion of sublethally damaged cells and the amount of intracellular compounds (proteins and compounds capable of absorbing at 280 nm) released after PEF exists.

7) APORTACIONES EN MATERIA DE APRENDIZAJE:

Este TFG me ha permitido obtener un conocimiento más profundo de los PEAV y del uso de un equipo real de pulsos eléctricos, así como de técnicas utilizadas para marcar y cuantificar la permeabilización celular (recuperación en medios con NaCl, microscopia de fluorescencia usando Ioduro de Propidio), además de aprender los fundamentos y metodología para de diversas técnicas de cuantificación del contenido proteico liberado al medio como las técnicas colorimétricas Bradford y BCA, y la espectroscopia UV.

De la misma forma ha servido para familiarizarme con parte del equipamiento presente en el laboratorio de Nuevas Tecnologías de Procesado de los Alimentos como el fluorímetro-espectrofotómetro para placas multipocillo, el cuenta-colonias automático, así el equipo de pulsos de alto voltaje y su respectivo software.

También me ha servido para introducirme de forma superficial en los campos de la modelización y representación gráfica de los datos obtenidos experimentalmente.

La realización de este trabajo también me ha permitido volver a utilizar y conocer en más profundidad técnicas que ya conocía como la microscopía de fluorescencia que utilicé por primera vez en microbiología y el recuento y siembra en placa con agar que use principalmente en las prácticas de análisis microbiológico de los alimentos en segundo curso.

Finalmente, y probablemente siendo seguramente el aspecto más relevante para mi formación, este TFG me ha permitido conocer e iniciarme en la investigación científica y su metodología, principalmente en el sentido de concienciarme de la necesidad de llevar a cabo una estructura ordenada de ensayos y de la necesidad de trabajar con una metodología optimizada y robusta para así poder obtener conclusiones válidas.

8) BIBLIOGRAFÍA:

- Álvarez, I., Condón, S. and Raso, J., 2006. Microbial inactivation by pulsed electric fields. En: *Pulsed Electric Field Technology for the Food Industry* (Raso, J. and Heinz, V., Eds.): 95-128. Springer.
- Álvarez, I., Pagán, R., Raso, J. and Condón, S., 2002. Environmental factors influencing the inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *Letters in Applied Microbiology*, 35: 489–493.
- Álvarez, I., Pagán, R., Raso, J. and Condón, S., 2003. The influence of process parameters for the inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology*, 87: 87-95.
- Álvarez, I., Raso, J., Palop, A., and Sala, F. J., 2000. Influence of different factors on the inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology*, 55: 143–146.
- Álvarez, I., Raso, J., Sala, F. J. and Condón, S., 2003. Inactivation of *Yersinia enterocolitica* by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology*, 20: 691–700.
- Aronsson, K. and Ronner, 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: 105–112.
- Aronsson, K., Ronner, U., 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: 19– 32
- Arroyo, C., 2008. Resistance of *Enterobacter sakazakii* to Heat and PEF processes. *How to present your work? Practice for the case of emergency Young scientists in start position*. TCD Training Novel Q. 3-5.
- 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., Mañas, P. and 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., Sagarzazu, N., Pagán, R., Condón, S. and 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.
- Coster, H. G. L. and Zimmermann, U., 1975. The mechanism of electrical breakdown in the membrane of *Valonia utricularis*. *Journal of Membrane Biology*, 22: 73–90.
- Dawson, R. M. C., Elliot, D. C., Elliot, W. H. and Jones, K. M., 1974. En: *Data for Biochemical Research*. Oxford at Clarendon Press: Oxford.
- Food and Drug Administration, 2012. Bad Bug Book. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Second Edition. [*Staphylococcus aureus*: 87-89]
- García, D., Gómez, N., Álvarez, I., Raso, J. and Condón, S., 2005 b. 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: 7–14.
- García, D., Gómez, N., Condón, S., Raso, J. and Pagán, R., 2003. Pulsed electric fields cause sublethal injury in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 36: 140-144.
- García, D., Gómez, N., Raso, J. and Pagán, R., 2005 a. Bacterial resistance after pulsed electric fields depending on the treatment medium pH. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 388-395.
- Goldring, D. J. P., 2015. Western Blotting Methods and Protocols. En: *Methods in Molecular biology 1312*, (Kurien, B. T., Scofield, R. H., Eds): 41-48. Humana Press.

- Ohshima, T. and Sato, M., 2004. Bacterial Sterilization and Intracellular Protein Release by a Pulsed Electric Field *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. (Scheper T. Ed). 90: 113–133
- Pierce BCA Protein Assay Kit - Thermo Fisher Scientific [Internet]. Thermofisher.com. 2016 [fecha de actualización: 27-06-2013 fecha de consulta : 11-06-2016]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225>
- Public Health Agency of Canada. "Pathogen safety data sheet - infectious substances section I - infectious agent: *Staphylococcus aureus*" [Internet]. Canadá; 2011, [fecha de actualización: 30-04-2012; fecha de consulta: 09-04-2016]. Disponible en: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/staphylococcus-aureus-eng.php>
- Quick Start Bradford Protein Assay || Bio-Rad [Internet]. Bio-rad.com. 2016 [fecha de actualización: 12-08-2015 fecha de consulta: 11-06-2016]. Disponible en: <http://www.bio-rad.com/es-es/product/quick-start-bradford-protein-assay>
- Stanley, D. W., 1991. Biological membrane deterioration and associated quality losses in food tissues. *Critical Reviews in Food Science*, 30: 487–553.
- Zimmermann, U., Pilwat, G. and Riemann, F., 1974. Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophysical Journal*. 14: 881-899.