



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**Diferencias fisiológicas en subpoblaciones
de un cultivo de *Salmonella typhimurium***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA BÁSICA**

P R E S E N T A:

GRISEL CÓRDOVA VILLALBA

Facultad de Medicina



DIRECTOR DE TESIS: DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA

CIUDAD UNIVERSITARIA, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Con amor,
para la luz que llena de alegría mi vida
día con día: mi familia*

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Rafael Camacho Carranza por dirigir este trabajo con paciencia y dedicación.

Al Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre por aceptarme como integrante de su laboratorio y por su ayuda en el desarrollo de este trabajo.

A la Biol. Sandra Luz Hernández Ojeda por su ayuda técnica en el laboratorio y su amable atención.

A la Dra. Tzipe Govezensky por realizar el análisis estadístico de este trabajo, así como por compartir su conocimiento con esmero y entusiasmo.

A la Dra. Blanca Estela Hernández Guadarrama por enseñarme, con calma y dedicación, los fundamentos y las técnicas necesarias para desempeñar este trabajo.

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez por su apoyo oportuno y profesional con la toma de fotografías en el microscopio.

Al Dr. Pavel Petrosyan por su ayuda acertada en la resolución de problemas técnicos y su amable disposición.

A la Lic. Lucía Brito Ocampo por brindarme la orientación y ayuda apropiadas para la búsqueda bibliográfica de una manera sumamente eficaz y agradable.

A María Muñoz García por su enorme disponibilidad, paciencia y amabilidad para ayudarme en la búsqueda de material bibliográfico.

A Martha Cariño Aguilar por su cortés y acertada ayuda para obtener recursos bibliográficos.

Al laboratorio de la Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez por prestarme su equipo de espectrofotometría, así como por la atención brindada.

A la M. en C. Sitlali del Rosario Olguín Reyes, a la M. en C. Rebeca Santes Palacios y al M. en C. José Noel Sánchez Cabañas por su colaboración para solucionar problemas técnicos en los experimentos.

A los miembros de mi jurado de examen de licenciatura por las aportaciones y correcciones hechas a este trabajo: Dr. Arturo Carlos Il Becerra Bracho, Dra. Bertha González Pedrajo, Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán y Dr. Roberto Cabrera Contreras.

A la UNAM por darme la oportunidad de conocer cosas que jamás imaginé.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
PRESENTACIÓN	2
INTRODUCCIÓN.....	3
Densidad celular y estado fisiológico	3
Método para separar por densidad una población microbiana: gradiente de percoll	4
Organismo de estudio: <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	4
Fases de la curva de crecimiento.....	4
Estado fisiológico y su evaluación.....	6
Estrés	6
Hiperosmolaridad	7
Calor	8
pH ácido.....	9
Respuestas de estrés extracitoplásmicas.....	10
Cepas mutantes.....	11
<i>SulA</i>	12
<i>RecA</i>	12
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	13
Objetivo general.....	13
Objetivos particulares.....	13
METODOLOGÍA	14
Cepas y condiciones de crecimiento	14
Gradiente de percoll.....	14
Cuenta viable	14
Determinación de la resistencia a estrés por calor	15
Determinación de la resistencia a estrés por hiperosmolalidad	15
Determinación de la resistencia a estrés por pH ácido	15
Microscopía	15
Análisis estadístico	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
Obtención de subpoblaciones en las cepas silvestre, <i>recA</i> y <i>sulA</i> por medio de gradientes de percoll.	16
Subpoblaciones sometidas a diferentes tipos de estrés	16
Respuesta a diferentes tipos estrés de las subpoblaciones de la cepa silvestre	21
Estrés por hiperosmolaridad en la cepa silvestre	21
Estrés por calor en la cepa silvestre.....	24
Estrés por pH ácido en la cepa silvestre.....	27
Respuesta a diferentes tipos de estrés de las subpoblaciones de la cepa <i>recA</i>	30
Estrés por hiperosmolaridad de la cepa <i>recA</i>	30
Estrés por calor a la cepa <i>recA</i>	31
Estrés por pH ácido en la cepa <i>recA</i>	32
Respuesta a diferentes tipos de estrés de las subpoblaciones de la cepa <i>sulA</i>	33
Estrés por hiperosmolaridad en la cepa <i>sulA</i>	33
Estrés por calor en la cepa <i>sulA</i>	34
Estrés por pH ácido en la cepa <i>sulA</i>	35
Respuesta de las cepas a diferentes tipos de estrés	37
Respuesta de las subpoblaciones a diferentes tipos de estrés	38
CONCLUSIONES	40

PERSPECTIVAS	41
BIBLIOGRAFÍA.....	42
APÉNDICE	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura superficial de las bacterias Gram negativas.	5
Figura 2. Gradientes de percoll de las cepas silvestre, <i>recA</i> y <i>sulA</i>	17
Figura 3. Respuesta de la cepa silvestre a estrés por hiperosmolaridad evaluada mediante cuenta viable.	21
Figura 4. Microscopía de la cepa silvestre después de aplicar estrés por hiperosmolaridad.	23
Figura 5. Respuesta de la cepa silvestre a estrés por calor evaluada mediante cuenta viable.	24
Figura 6. Microscopía de la cepa silvestre después de aplicar estrés por calor.	26
Figura 7. Respuesta de la cepa silvestre a estrés por pH ácido evaluada mediante cuenta viable.	27
Figura 8. Microscopía de la cepa silvestre después de aplicar estrés por pH ácido.	29
Figura 9. Respuesta de la cepa <i>recA</i> a estrés por hiperosmolaridad evaluada mediante cuenta viable.	30
Figura 10. Respuesta de la cepa <i>recA</i> a estrés por calor evaluada mediante cuenta viable.	31
Figura 11. Respuesta de la cepa <i>recA</i> a estrés por pH ácido evaluada mediante cuenta viable.	32
Figura 12. Respuesta de la cepa <i>sulA</i> a estrés por hiperosmolaridad evaluada mediante cuenta viable.	34
Figura 13. Respuesta de la cepa <i>sulA</i> a estrés por calor evaluada mediante cuenta viable.	35
Figura 14. Respuesta de la cepa <i>sulA</i> a estrés por pH ácido evaluada mediante cuenta viable.	36
Figura 1A. Respuesta de la cepa silvestre a estrés por hiperosmolaridad, evaluada mediante cuenta viable y representada como (UFC con estrés)/(UFC sin estrés).	44
Figura 2A. Respuesta de la cepa silvestre a estrés por calor, evaluada mediante cuenta viable y representada como (UFC con estrés)/(UFC sin estrés).	44
Figura 3A. Respuesta de la cepa silvestre a estrés por pH ácido, evaluada mediante cuenta viable y representada como (UFC con estrés)/(UFC sin estrés).	45
Figura 4A. Respuesta de la cepa <i>recA</i> a estrés por hiperosmolaridad, evaluada mediante cuenta viable y representada como (UFC con estrés)/(UFC sin estrés).	45
Figura 5A. Respuesta de la cepa <i>recA</i> a estrés por calor, evaluada mediante cuenta viable y representada como (UFC con estrés)/(UFC sin estrés).	46
Figura 6A. Respuesta de la cepa <i>recA</i> a estrés por pH ácido, evaluada mediante cuenta viable y representada como (UFC con estrés)/(UFC sin estrés).	46
Figura 7A. Respuesta de la cepa <i>sulA</i> a estrés por hiperosmolaridad, evaluada mediante cuenta viable y representada como (UFC con estrés)/(UFC sin estrés).	47
Figura 8A. Respuesta de la cepa <i>sulA</i> a estrés por hiperosmolaridad, evaluada mediante cuenta viable y representada como (UFC con estrés)/(UFC sin estrés).	47
Figura 9A. Respuesta de la cepa <i>sulA</i> a estrés por hiperosmolaridad, evaluada mediante cuenta viable y representada como (UFC con estrés)/(UFC sin estrés).	48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Respuesta de las subpoblaciones de la cepa silvestre ante estrés por hiperosmolaridad, calor y pH ácido.....	18
Tabla 2. Respuesta de las subpoblaciones de la cepa <i>sulA</i> ante estrés por hiperosmolaridad, calor y pH ácido.....	19
Tabla 3. Respuesta de las subpoblaciones de la cepa <i>recA</i> ante estrés por hiperosmolaridad, calor y pH ácido.....	20
Tabla 4. Respuesta de las 3 cepas ante los tipos de estrés a los que fueron sometidas.....	37
Tabla 5. Respuesta del cultivo sin separar y de sus 3 subpoblaciones ante los tipos de estrés a los que fueron sometidas.....	39

RESUMEN

Un cultivo en fase exponencial de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) está compuesto por subpoblaciones con densidades diferentes, las cuales pueden ser separadas por un gradiente de percoll (sílice coloidal con una toxicidad baja para las células).

La densidad celular es la relación masa/volumen que puede cambiar de acuerdo a la concentración de ciertas moléculas orgánicas e inorgánicas en las células. Este hecho puede originar estados fisiológicos distintos en un cultivo bacteriano.

Aunque no se conoce con exactitud a qué se debe la separación de subpoblaciones, éstas podrían presentar respuestas diferentes a determinado tipo de estrés si su densidad es distinta.

En el presente trabajo se separaron cultivos en fase exponencial de *S. Typhimurium* de las cepas silvestre y las mutantes *recA* y *suIA*, por medio de un gradiente de percoll. En las tres cepas, se recolectaron 3 bandas que poseían una densidad cercana, y se evaluó su respuesta a estrés por hiperosmolaridad, calor y pH ácido. Se encontró que algunas subpoblaciones tenían comportamientos distintos entre ellas y con respecto al cultivo sin separar, en cuanto a viabilidad. Se identificaron subpoblaciones que ante un mismo tipo de estrés eran más resistentes que otras. Tal vez podrían existir factores que están involucrados en la respuesta a estrés, otorgando una densidad diferente a cada subpoblación.

PRESENTACIÓN

A través de un gradiente isopícnico (que separa partículas en función de su densidad), diversos cultivos microbianos pueden ser separados en varias subpoblaciones, cuyo número varía dependiendo de la fase de crecimiento en la cual se encuentren (Makinoshima *et al.*, 2002).

Esta separación puede deberse a varios factores que modifiquen la relación masa-volumen, como contenidos diferentes de diversas biomoléculas (DNA, proteína, lípidos, carbohidratos, o bien diferente tipos de estos dos últimos), distinta concentración de osmolitos o iones en el citoplasma, o bien una composición desigual en cuanto a organelos o membranas en las células (Makinoshima *et al.*, 2003; Akerlund *et al.*, 1995; Koch, 1993).

Si bien no sabemos cuáles de las causas ya mencionadas pudieran estar separando un cultivo microbiano, en este trabajo buscamos entender cuál es el significado biológico de la separación de subpoblaciones, evaluando la respuesta de cada una de ellas ante diferentes tipos de estrés.

Se observó que entre algunas de las subpoblaciones de un cultivo en fase exponencial de *S. Typhimurium* se presenta un estado fisiológico distinto. Esto nos sugiere que a pesar de que un cultivo sea clonal y esté en fase exponencial, no hay homeogeneidad entre las células que conforman la población, lo que da una variedad de comportamientos fisiológicos, que al separarse en subpoblaciones, no responden de la misma manera que cuando están interactuando.

INTRODUCCIÓN

Densidad celular y estado fisiológico

La densidad es la relación de la masa entre el volumen. En el caso de la célula, esta propiedad está determinada por diversos factores, como concentración diferente de iones u osmolitos, lípidos, carbohidratos, DNA y proteína, distinto contenido de G+C, cantidad de cuerpos de inclusión o de membranas, características que están relacionadas con la etapa del ciclo celular en la que se encuentra la célula, así como con las condiciones a las que está sometida. Estas diferencias provocan un estado fisiológico distinto en las células (Makinoshima *et al.*, 2003; Akerlund *et al.*, 1995; Koch, 1993).

Un ejemplo de lo anterior fue descrito en un trabajo, en el que por microscopía electrónica ven que el número de flagelos en la cepa silvestre de *Escherichia coli*, aumenta conforme la densidad celular lo hace, a lo largo de la fase exponencial (Makinoshima *et al.*, 2003).

En otro trabajo se reportó la separación de distintos tipos de bacterias metanotróficas. Existen 3 clases de bacterias que pueden utilizar el metano como única fuente de carbono y se clasifican en: a) tipo I, tienen racimos o pilas de membranas intracitoplasmáticas, su contenido de G+C va del 50 al 54%, no fijan nitrógeno atmosférico y su ciclo de Krebs es incompleto, b) tipo II, poseen un sistema de membranas intracitoplasmáticas periféricas pareadas, su contenido de G+C va del 58 al 66%, fijan nitrógeno atmosférico y su ciclo de Krebs es completo, c) tipo X, se caracteriza por el mismo tipo de distribución de membranas que la tipo I, aunque existen ciertas diferencias bioquímicas entre ambas. Mediante el uso de un gradiente de percoll que separa a las partículas de acuerdo a su densidad, se consiguió agrupar a las bacterias de tipo I y de tipo X en la zona más densa y a las de tipo II en la zona menos densa (Putzer *et al.*, 1991).

Estos casos muestran que la densidad celular depende de los componentes celulares que intervienen en el desempeño biológico de esas bacterias.

Método para separar por densidad una población microbiana: gradiente de percoll

Para realizar una separación isopícnica de partículas, es decir, una separación por densidad de los materiales, se emplea generalmente percoll. El percoll es un sílice coloidal, cuyas partículas miden de 15 a 30 nm, y están cubiertas por una capa de polivinilpirrolidona. A diferencia de otros materiales (como ludox o ficoll) que también se emplean para hacer este tipo de gradientes, el percoll presenta ciertas características que lo hacen más adecuado para trabajar con células o componentes celulares, por ejemplo: viscosidad baja, pH que puede ajustarse en un rango de 5.5 a 10 y baja osmolaridad. Estas propiedades le dan al percoll una toxicidad baja, lo cual permite obtener un gran número de células viables después de utilizar un método donde se haga uso de dicho material (Laurent *et al.* I, 1980; Laurent *et al.* II, 1980; Laurent y Pertoft III, 1980).

Con este método se han separado varias subpoblaciones de cultivos en fase exponencial de bacterias como *Escherichia coli* B, *Escherichia coli* K-12 y *Bacillus subtilis* de levaduras como *Schizosaccharomyces pombe* (Dwek *et al.*, 1980).

En este trabajo se utiliza este método para separar un cultivo en fase exponencial de *S. Typhimurium*.

Organismo de estudio: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

S. Typhimurium es una bacteria Gram negativa (figura 1) que forma parte de la familia de las enterobacterias. Varios géneros de esta familia están estrechamente relacionados con los vertebrados, ya sea como parte de su microbiota o causando enfermedades. Sin embargo, una de las razones principales para usar a *S. Typhimurium* en el estudio de diversos mecanismos celulares, es la existencia de herramientas genéticas y moleculares desarrolladas para su estudio, su facilidad para crecer en un medio de cultivo de laboratorio, su baja virulencia y su relativa “sencillez” comparada con otro tipo de células, lo cual hace que explorar estos procesos sea menos complicado a nivel experimental (Neidhardt *et al.*, 1996).

Fases de la curva de crecimiento

El crecimiento de una población microbiana, entendido como un incremento en el número de células, tiene 4 fases (Brock *et al.*, 2015):

- 1) Latencia: en esta etapa las células sintetizan los componentes que requieren para dividirse.
- 2) Exponencial: es consecuencia de que una célula se divide y dé origen a dos. Se considera que estas células se encuentran en el estado fisiológico más óptimo, por lo que se usan frecuentemente para realizar experimentos enzimáticos o estructurales.

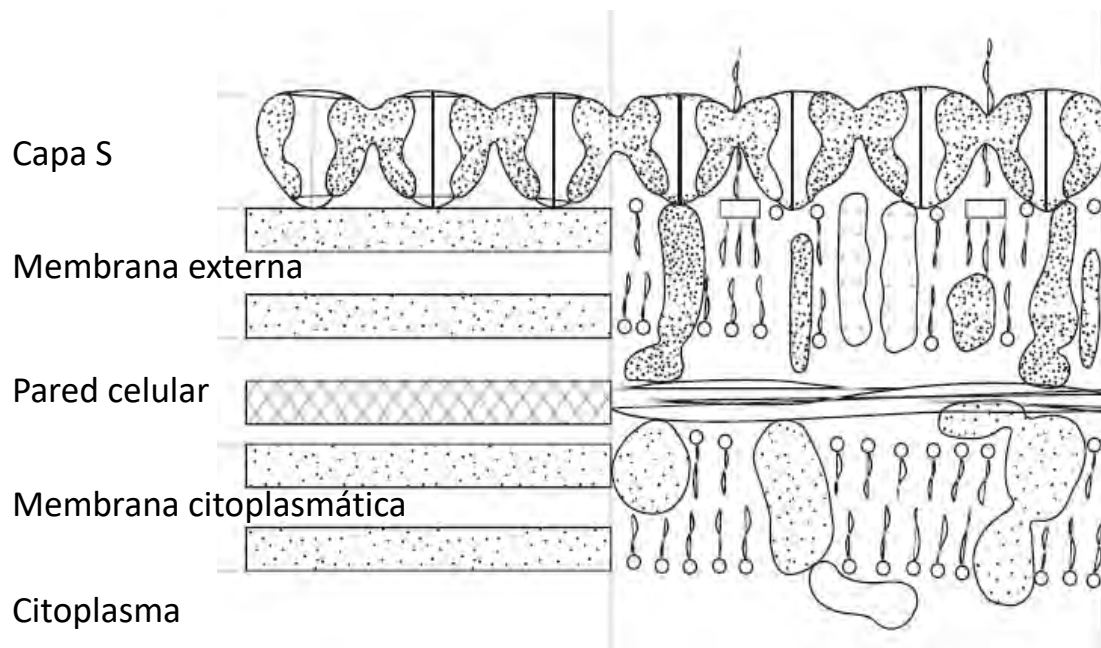


Figura 1. Estructura superficial de las bacterias Gram negativas. La membrana citoplasmática está formada por una bicapa de fosfolípidos donde se encuentran asociadas algunas proteínas. La pared celular está constituida por una capa de peptidoglicano. La membrana externa a diferencia de la interna tiene lipopolisacáridos, también cuenta con proteínas de membrana y porinas. La capa S posee proteínas y glicoproteínas. Tomada de Kim y Gadd, 2008.

- 3) Estacionaria: se alcanza este punto cuando un nutriente esencial del medio de cultivo se termina, o bien, por la acumulación de productos de desecho tóxicos, lo cual inhibe el crecimiento exponencial. Durante este periodo no hay un cambio en el número de células. Para adaptarse a las nuevas condiciones del medio, las bacterias adquieren un metabolismo distinto mediante cambios en la regulación de los genes, que conlleva a una expresión diferencial, o bien, a través de mutaciones (Navarro, *et al.*, 2010).

- 4) Muerte: también es exponencial y puede ser por lisis o por muerte celular programada (esta última puede ser mediante un mecanismo toxina-antitoxina) (Navarro, *et al.*, 2010).

Para realizar los experimentos de este trabajo se emplean células que están a la mitad de la fase exponencial (mid-log), pues en esta etapa su fisiología no depende de mutaciones que las bacterias adquieren para adaptarse a un nuevo ambiente, como sucede en la fase estacionaria.

Estado fisiológico y su evaluación

Un estado fisiológico se caracteriza por un tamaño y/o composición química particular de las células (Schaechter *et al.*, 1958) y aunque existen diversas formas de evaluar estos rasgos, una de los más comunes es medir su capacidad de reproducirse en un medio de laboratorio. Otra forma es ver cómo responden ante algún tipo de estrés.

Estrés

El estrés es el efecto de un tratamiento subletal (como exposiciones a procesos físicos y químicos) sobre una población, que disminuye su viabilidad pero no la extermina completamente (Wesche *et al.*, 2009).

La respuesta a estrés es el gasto de energía metabólica empleada para sintetizar componentes celulares que restablezcan la condición previa al estrés, o bien, para generar un nuevo fenotipo que resista el estrés (Tomado del documento Stress response in bacteria, sin fecha).

El estado fisiológico de células que resisten algún tipo de estrés es distinto de las que no lo hacen, es por eso que elegimos el estrés como un medio para evaluar el estado fisiológico de cada una de las subpoblaciones separadas a través del gradiente de percoll.

Existen diversos tipos de estrés, sin embargo, en este trabajo nos enfocamos en tres que se ha descrito están relacionados: hiperosmolaridad, temperaturas elevadas y pH ácido. La razón por la cual las respuestas a estos estímulos están asociadas, probablemente se deba a que son las condiciones a las que se somete la bacteria cuando habita un hospedero (Snyder *et al.*, 2013).

Hiperosmolaridad

Las bacterias mantienen una concentración de agua menor en el interior con respecto al exterior. Es por esto, que el agua tiende a entrar a la célula, aumentando la presión hidrostática. A la presión ejercida por la membrana citoplásmica sobre la pared celular se le conoce como turgencia y a la turgencia se opone la tensión de la envoltura. Lo anterior depende de la cantidad de soluto tanto en el interior como en el exterior (Neidhardt *et al.*, 1996).

Los mecanismos de osmoregulación son los encargados de mantener la turgencia dentro de los límites tolerables, para que la célula no se deshidrate ni se lise (Neidhardt *et al.*, 1996). Esto se logra mediante varios mecanismos: las acuaporinas (proteínas integrales de membrana que forman poros y que funcionan como canales de agua [Kruse *et al.*, 2006]) que no son esenciales para la célula; y la regulación de la concentración de solutos tanto en el citoplasma como en el periplasma, que son los medios principales para enfrentar este estrés (Moat *et al.*, 2002).

Cuando la célula es sometida a un ambiente hiperosmótico, su turgencia disminuye. Aún no se conoce con exactitud cómo la célula reconoce este cambio, pero puede ser mediante la percepción de la presión hidrostática interna, la presión diferencial o el área de la membrana citoplásmica, el cambio en el volumen celular o por variaciones en la concentración de solutos o del agua interna, así como por proteínas de membrana (Sleator y Hill, 2002).

Una vez que se percibió el estímulo, la primera respuesta que desencadena la célula es permitir la entrada de K^+ . Lo hace mediante dos sistemas constitutivos de baja afinidad (Trk y Kup [TrkD]) y uno inducible de alta afinidad (Kdp). En consecuencia el citoplasma se alcaliniza y comienza la síntesis de glutamato. Con estas acciones la turgencia comienza a restaurarse nuevamente (Moat *et al.*, 2002).

La respuesta secundaria consiste en la absorción o síntesis de osmoprotectores (moléculas solubles en agua sin carga neta a pH fisiológico e incapaces de interactuar con proteínas) como glicina betaína, carnitina y prolina (Sleator y Hill, 2002). Esto ocasiona que la concentración de K^+ disminuya después de un tiempo (Moat *et al.*, 2002).

La adaptación a este estrés no sólo se lleva a cabo en el citoplasma sino también en la membrana plasmática y en el espacio periplásmico. En la membrana se incrementa el número de fosfolípidos iónicos y en el espacio periplásmico se regula la síntesis de

oligosacáridos derivados de membrana. Otra respuesta es la regulación de la síntesis de porinas de membrana, que está dada por el sistema de dos componentes EnvZ/OmpR, el cual es un regulador global de la virulencia (Sleator y Hill, 2002), y además interviene en la expresión flagelar, la división celular así como en la tolerancia a un pH ácido (Moat *et al.*, 2002). La regulación de la osmolaridad, aparte de estar relacionada con los comportamientos fisiológicos ya mencionados, también mejora la tolerancia a temperaturas altas y bajas (Neidhardt *et al.*, 1996).

El factor σ^S , que está involucrado en la transcripción de genes de fase estacionaria y de una respuesta de estrés general, también participa en condiciones de osmolaridad alta en el medio (Snyder *et al.*, 2013).

Calor

La mayoría de las bacterias son mesófilas, es decir, que no crecen a temperaturas extremas, sino en un rango que va desde 20 a 40 °C (Moat *et al.*, 2002). Cuando la temperatura se incrementa, las bacterias rápidamente inducen al menos 30 genes diferentes que codifican Hsps (proteínas de choque térmico por sus siglas en inglés). Sin embargo, cualquier otro tipo de estrés que dañe proteínas es capaz de promover esta respuesta (Snyder *et al.*, 2013).

Las Hsps son proteínas con función proteasa (como Lon y Clp que degradan proteínas que ya no pueden volver a plegarse) o chaperona (por ejemplo GroEL, DnaK, DnaJ y GrpE que se unen a las proteínas desnaturalizadas para regresarlas a su conformación antes del estrés o bien las marcan para que se degraden si continuaron desnaturalizadas) (Snyder *et al.*, 2013).

El factor de la RNA polimerasa σ^{32} (también conocido como σ^H) reconoce los promotores de los genes que codifican las Hsps. El gen de este factor es *rpoH* y se regula a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional (Snyder *et al.*, 2013).

La regulación transcripcional se debe a que *rpoH* tiene 4 promotores, 3 de los cuales dependen del factor σ^{70} . El gen *rpoD*, que codifica σ^{70} , es también un gen de choque térmico inducido por σ^H . El cuarto promotor es reconocido por σ^E que también transcribe otros genes de respuesta a estrés por calor (Moat *et al.*, 2002).

En el caso de la regulación traduccional, el mRNA de *rpoH* existe constitutivamente en la célula, pero tiene una estructura secundaria a bajas temperaturas que esconde la

región TIR (región de iniciación traduccional por sus siglas en inglés) y que impide la unión del ribosoma. Sin embargo, cuando la temperatura se incrementa esta estructura se desvanece y el ribosoma puede acceder a esa secuencia (Snyder *et al.*, 2013).

En cuanto a la regulación postraduccional, está dirigida por DnaK, que es una chaperona que en condiciones normales se une a las proteínas recién sintetizadas para plegarlas adecuadamente, entre las que se encuentra σ^H , provocando que el factor sea más susceptible a degradación por las proteasas FtsH y que su actividad transcripcional se inhiba. Cuando hay un incremento en la temperatura, DnaK se une a las proteínas desnaturalizadas, dejando menos unidades disponibles para unirse con σ^H , lo cual hace que el factor se vuelva más estable e incremente la transcripción de los genes que codifican las Hsps, entre los que se encuentra *dnaK* (Moat *et al.*, 2002).

Estos mecanismos de regulación explican por qué disminuye la síntesis de Hsps al bajar la temperatura o después de que pase un lapso de tiempo (Snyder *et al.*, 2013).

pH ácido

S. Typhimurium, así como una gran parte de especies bacterianas, crece en un rango de pH neutro que va de 5 a 9, es decir, es neutrófila. Sin embargo, es capaz de sobrevivir a ambientes cuyo pH está fuera de este intervalo (Moat *et al.*, 2002), y aunque el pH del medio varíe en gran medida, las bacterias poseen mecanismos que les permiten mantener un pH interno (es decir el pH del citoplasma) constante (Lund *et al.*, 2014).

Cuando se somete a las bacterias a estrés por pH ácido, la membrana citoplásmica funciona como la barrera principal para evitar el paso de ácidos o protones. Sin embargo, no lo logra eficientemente bajo estas condiciones, pues los ácidos fuertes pueden cruzar la membrana en su forma no disociada y disociarse cuando llegan al citoplasma, mientras que los protones pueden entrar por los canales o porque la membrana está dañada (Gutknecht y Walter, 1981). La entrada de estas moléculas puede disminuir la viabilidad de la célula mediante la disminución de la eficiencia de sus enzimas, desnaturalización de proteínas, y por daños en membrana y DNA (Lund *et al.*, 2014).

Para contender con este ambiente, las bacterias han desarrollado dos tipos de respuesta de acuerdo al grado del estrés: 1) Respuesta de tolerancia al ácido (ATR por sus siglas en inglés) para combatir un pH ácido no letal y 2) Resistencia a condiciones ácidas

extremas dependientes de aminoácidos (XAR por sus siglas en inglés). Algunas bacterias poseen ambas, mientras que otras sólo cuentan con ATR (Lin *et al.*, 1995).

Entre los mecanismos que se ven involucrados en la respuesta ATR tenemos la F_1F_0 -ATPasa, que además de contar con actividad ATP-sintasa, en condiciones ácidas funciona como ATPasa; inducción de chaperonas citoplásmicas y periplásmicas, así como del sistema Clp; modificación de los fosfolípidos de la membrana interna, reemplazando ácidos grasos insaturados por ácidos grasos de ciclopropano; e hidrólisis de urea por la enzima ureasa, dando lugar a la producción de NH_3 (Lund *et al.*, 2014).

En la respuesta XAR encontramos sistemas de descarboxilasas antiportadores dependientes de aminoácidos que consisten en una proteína citoplásmica (la descarboxilasa) y un antiportador, la primera lleva a cabo una reacción de descarboxilación en aminoácidos específicos (glutamato, lisina, arginina y ornitina) y el segundo permite la entrada selectiva de estos aminoácidos (cargados de una forma determinada) y la salida de los productos de la reacción de descarboxilación.

Se ha descrito que la percepción de pH ácido se da por al menos dos sistemas: 1) el sistema de dos componentes PhoPQ, donde PhoQ detecta la presencia de cationes divalentes y péptidos antimicrobianos, se autofosforila y luego transfiere el fosfato a PhoP, que activa los genes ATR (Prost *et al.*, 2007). Algunos genes de la respuesta ATR están regulados por RpoS y OmpR en fase estacionaria y por Fur y PhoPQ en fase exponencial (Lund *et al.*, 2014); 2) el sistema de un componente CadC detecta pH ácido y lisina, activando la expresión del sistema de descarboxilasa dependiente de lisina y también induce la expresión de las porinas OmpC y OmpF, al mismo tiempo que reprime la expresión de proteínas que llevan a cabo glucólisis y producción de energía (Lee *et al.*, 2007).

Respuestas de estrés extracitoplásmicas

Las respuestas de estrés extracitoplásmicas se encargan de proteger la integridad de las membranas de la bacteria (Snyder *et al.*, 2013). Pueden ser inducidas por varios factores, entre los que están los tipos de estrés ya mencionados.

Una forma en la que la bacteria percibe el estrés en la membrana externa es por el sistema de dos componentes CpxA-CpxR. CpxA es la proteína sensor cinasa que se autofosforila cuando algunas proteínas (como las de formación de pili) se acumulan en el

periplasma por un daño en la membrana externa. CpxR es el regulador transcripcional que activa proteasas y chaperonas del periplasma, las cuales combaten esta situación. Este sistema también es capaz de regular la proporción de porinas OmpF/OmpC (Snyder *et al.*, 2013).

Otra vía, es por σ^E (factor sigma extracitoplásmico), que se une principalmente a promotores de genes cuyos productos actúan en el periplasma, como proteasas y chaperonas, pero también se une a uno de los promotores de *rpoH*. Bajo condiciones sin estrés, σ^E es reprimido por el factor anti-sigma RseA, que es una proteína transmembranal de la membrana externa y que secuestra a σ^E en la membrana. Cuando ésta es dañada, las proteínas Omp se acumulan en el espacio periplásmico y activan a la proteasa DegS, la cual proteoliza el dominio periplásmico RseA. Otra proteasa, YaeL, es reclutada para degradar el dominio transmembranal de RseA, liberando a σ^E y permitiendo que promueva la transcripción de los genes de respuesta a estrés extracitoplásmicos (Snyder *et al.*, 2013).

Cepas mutantes

Se decidió usar cepas mutantes como una herramienta que permitiera observar si en la separación de bandas, así como en su respuesta a estrés, estaban involucrados procesos de filamentación (*sulA*) o bien de reparación del DNA (*recA*).

Se eligió la mutante *sulA* porque en algunos tipos de estrés, la población en vez de disminuir, aumentó. Por lo que se buscaba descartar que las observaciones se debieran a la formación de filamentos.

Se trabajó con la mutante *recA* porque los tres tipos de estrés generan daño al DNA de manera directa (pH) o indirecta (hiperosmolaridad y calor). Lo cual debería hacer que esta cepa fuera menos resistente a los tres tipos de estrés.

Tanto *sulA* como *recA*, forman parte del regulón SOS. SOS es una respuesta inducida por daño severo al DNA. Para que la célula pueda sobrevivir a esta situación, los genes que integran SOS emplean estrategias como retrasar la división celular hasta que el daño haya sido reparado (como es el caso de *SulA*) o bien, al permitir que la célula replique su DNA por síntesis de translesión (sistema de reparación propenso a error, en el que la DNA polimerasa II, IV o V [esta última con ayuda de *RecA*] procede sobre DNA gravemente dañado). La expresión del regulón SOS es controlada por el represor LexA. Esta proteína se une a las cajas SOS que se encuentran río arriba de los genes que integran el regulón,

cuando ésta es liberada, después de percibir daño al DNA, los genes SOS comienzan a transcribirse (Snyder *et al.*, 2013).

Los tipos de estrés mencionados, inducen daño al DNA, ya sea de forma directa (pH [Lund *et al.*, 2014]) o indirecta (hiperosmolaridad y calor).

SulA

SulA es una proteína que inhibe la actividad de la proteína FtsZ en condiciones de daño al DNA. FtsZ se encarga de formar un anillo bajo la membrana plásmica, a mitad de la célula; esta estructura proporciona la fuerza que se requiere para llevar a cabo la división celular (Erickson *et al.*, 2010). SulA impide la división celular, promoviendo la formación de filamentos, sin embargo, una vez que se repara el DNA la proteína Lon degrada a SulA, permitiendo que la división celular se realice. Por ello en la cepa *sulA* no se forman filamentos dependientes de la acción de esta proteína.

RecA

Se ha descrito que la proteína RecA participa en al menos 3 procesos distintos: 1) reparación del DNA por recombinación homóloga, que provee un mecanismo para reiniciar la replicación del DNA luego de una ruptura de la cadena templado, y donde RecA es requerida tanto para “activar” la hélice del DNA como para unirse a cadenas de una sola hebra (ssDNA por sus siglas en inglés) y de esta manera invadir al DNA de doble cadena (dsDNA por sus siglas en inglés); 2) inducción de la respuesta SOS mediante su unión a ssDNA y posteriormente a la proteína LexA, ayudando a que LexA se proteolise a sí misma, permitiendo así la transcripción de los genes SOS; 3) reparación del DNA por síntesis de translesión, formando parte del mutasoma (complejo formado por la DNA polimerasa V, RecA y ATP, el cual realiza síntesis de translesión) en su conformación activa (Snyder *et al.*, 2013). Por ello la cepa *recA* presenta dificultades para reparar el DNA y percibir daño al DNA.

HIPÓTESIS

Un cultivo de *S. Typhimurium* en fase exponencial está conformado por subpoblaciones, las cuales pueden ser separadas a través de un gradiente de percoll en función de su densidad, la que puede estar dada por una concentración distinta de biomoléculas, iones y/o algún tipo de estructura celular. Por lo tanto, se propone que estas subpoblaciones pueden ser fisiológicamente diferentes y tener una respuesta ante el estrés, a su vez, distintiva.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si las subpoblaciones de un cultivo a mitad de fase exponencial, de *S. Typhimurium*, obtenidas a partir de un gradiente percoll, tienen una respuesta diferente ante estrés por hiperosmolaridad (0.06 M de NaCl por una hora), calor (45 °C por 5 minutos) y pH ácido (4).

Objetivos particulares

- a) Separar en subpoblaciones un cultivo en fase exponencial de *S. Typhimurium*, de acuerdo a su densidad por medio de un gradiente de percoll.
- b) Evaluar por cuenta viable cómo responde cada subpoblación ante 3 tipos de estrés: hiperosmolaridad (0.06 M de NaCl por una hora), calor (45 °C por 5 minutos) y pH ácido (4), tomando como control su respuesta sin ningún tipo de estrés así como el cultivo sin ser fraccionado.
- c) Observar por microscopía la morfología de las bacterias bajo cada condición a las que fueron sometidas.
- d) Determinar si otros estados fisiológicos iniciales, como incapacidad para formar filamentos dependiente de *sulA* o una reparación al DNA ineficiente, pueden intervenir tanto en la separación de subpoblaciones como en su respuesta a diferentes tipos de estrés.

METODOLOGÍA

Cepas y condiciones de crecimiento

Se usaron 3 cepas de *S. Typhimurium*: silvestre, *sulA* y *recA*. Se crecieron en medio de cultivo Luria-Bertani (LB) sólido (agar al 1.5%) o líquido a 37°C.

Gradiente de percoll

A partir de un cultivo en LB agar, incubado a 37°C durante 12 horas, se tomó una colonia para inocular 5 mL de LB líquido. Este cultivo se agitó a 150 revoluciones por minuto (rpm), por un tiempo de 12 horas, a una temperatura de 37° C. De este cultivo se tomaron 0.030 mL para inocular 30 mL de LB líquido, se agitó a 120 rpm, a 37° C y en un espectrofotómetro se monitoreó su absorbancia para identificar el momento en que el cultivo llegaba a la mitad de la fase exponencial. En este punto, las bacterias se cosecharon por centrifugación a 10,000 rpm, a 4° C y se resuspendieron en 0.5 mL de un amortiguador de fosfatos (PBS). Posteriormente, este volumen se colocó en 9.5 mL de un gradiente de percoll previamente formado, y se centrifugaron en un rotor Beckman SW40Ti en una ultracentrífuga Beckman L80-70 M durante 30 minutos, a 20,000 rpm, a 4° C. Para obtener el pregradiente de percoll se centrifugan 8 mL de percoll y 1.5 mL de PBS en el rotor y ultracentrífuga mencionados anteriormente durante 1 hora, a 20,000 rpm, a 4° C (Makinoshima *et al.*, 2002).

Las subpoblaciones (bandas) obtenidas en este gradiente, se recolectaron a las 12 horas (pues era entonces cuando se podía observar con ayuda de luz blanca) con una jeringa de insulina, perforando el tubo y extrayendo la muestra.

Cuenta viable

De cada subpoblación obtenida en el gradiente de percoll, se hizo cuenta viable por goteo. Para ello, de las muestras obtenidas se hicieron diluciones en una solución 0.85% de NaCl y se colocaron 0.010 mL de cada dilución en LB agar con una micropipeta. Las cajas se incubaron a 37° C por 12 horas y después se contó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en un contador de colonias.

Determinación de la resistencia a estrés por calor

Las diluciones en 0.85% de NaCl se incubaron en baño María a 45° C por 5 minutos. Luego se hizo cuenta viable por goteo.

Determinación de la resistencia a estrés por hiperosmolalidad

Las diluciones se hicieron en NaCl 0.6 M (una concentración aproximadamente 4 veces mayor a la de 0.85%) y se incubaron por una hora a temperatura ambiente. Después se hizo la cuenta viable por goteo.

Determinación de la resistencia a estrés por pH ácido

Se preparó una solución de NaCl al 0.85% y se ajustó su pH a 4 con ácido clorhídrico. Las diluciones se hicieron en esta solución y se incubaron por una hora a temperatura ambiente, una vez transcurrido este tiempo se hizo cuenta viable por goteo.

Microscopía

En un microscopio de contraste de fases Olympus IX71, se observó cada subpoblación obtenida a partir del gradiente de percoll en cada una de las condiciones a las que se sometieron. Se agregó azida de sodio al 1% para impedir el movimiento de las bacterias.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con el software Sistema de Análisis Estadístico (SAS). Se analizaron los resultados de 3 experimentos, cada uno con 3 réplicas. En primer lugar, para ver si el estrés estaba funcionando, se hizo una comparación pareada con la prueba T de Student, $\alpha=0.05$, entre las UFC sometidas a estrés y las UFC que no fueron expuestas al estrés. Luego, para verificar la homogeneidad de varianza de los datos experimentales generados, y poder decidir el uso de pruebas paramétricas o no paramétricas, se utilizó la prueba de Levene, $\alpha=0.05$; los datos ingresados al programa para esta prueba, fue en forma de proporciones, es decir, (UFC sometidas a estrés)/(UFC sin ser expuestas al estrés). Después, para la comparación entre grupos se realizó la

prueba de análisis de varianza (ANOVA), $\alpha=0.05$, los datos empleados fueron en forma de proporciones. Finalmente, se llevó a cabo la prueba *post hoc* de rango estudentizada de Tukey, $\alpha=0.05$, donde los datos también fueron manejados como proporciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de subpoblaciones en las cepas silvestre, *recA* y *sulA* por medio de gradientes de percoll.

Las cepas silvestre, *recA* y *sulA* se separaron a través de un gradiente de percoll. En las tres se observaron 3 subpoblaciones mayoritarias. La banda 1 apareció en el menisco en las cepas silvestre y *recA*, pero en *sulA* la banda 1 apareció por debajo del menisco. En las 3 cepas la banda 2 fue la más visible y su densidad fue semejante en todas ellas. La última población, es decir, la banda 3 tuvo una densidad semejante entre *recA* y *sulA*, pero la cepa silvestre tuvo una densidad menor que éstas (figura 2). Estos resultados nos sugieren que la separación de subpoblaciones de acuerdo a su densidad, no depende en gran medida de las proteínas *sulA* y *recA*.

Subpoblaciones sometidas a diferentes tipos de estrés

Todas las subpoblaciones se sometieron a estrés por hiperosmolaridad, calor y pH ácido. Para definir si el estrés tenía algún efecto sobre las subpoblaciones se comparó la viabilidad de cada subpoblación antes y después de someterla a estrés. Los resultados se ven en las tablas 1 (de la cepa silvestre), 2 (de la cepa *sulA*) y 3 (de la cepa *recA*). Vemos que los tres tipos de estrés tienen un efecto en al menos una subpoblación de alguna de las tres cepas.

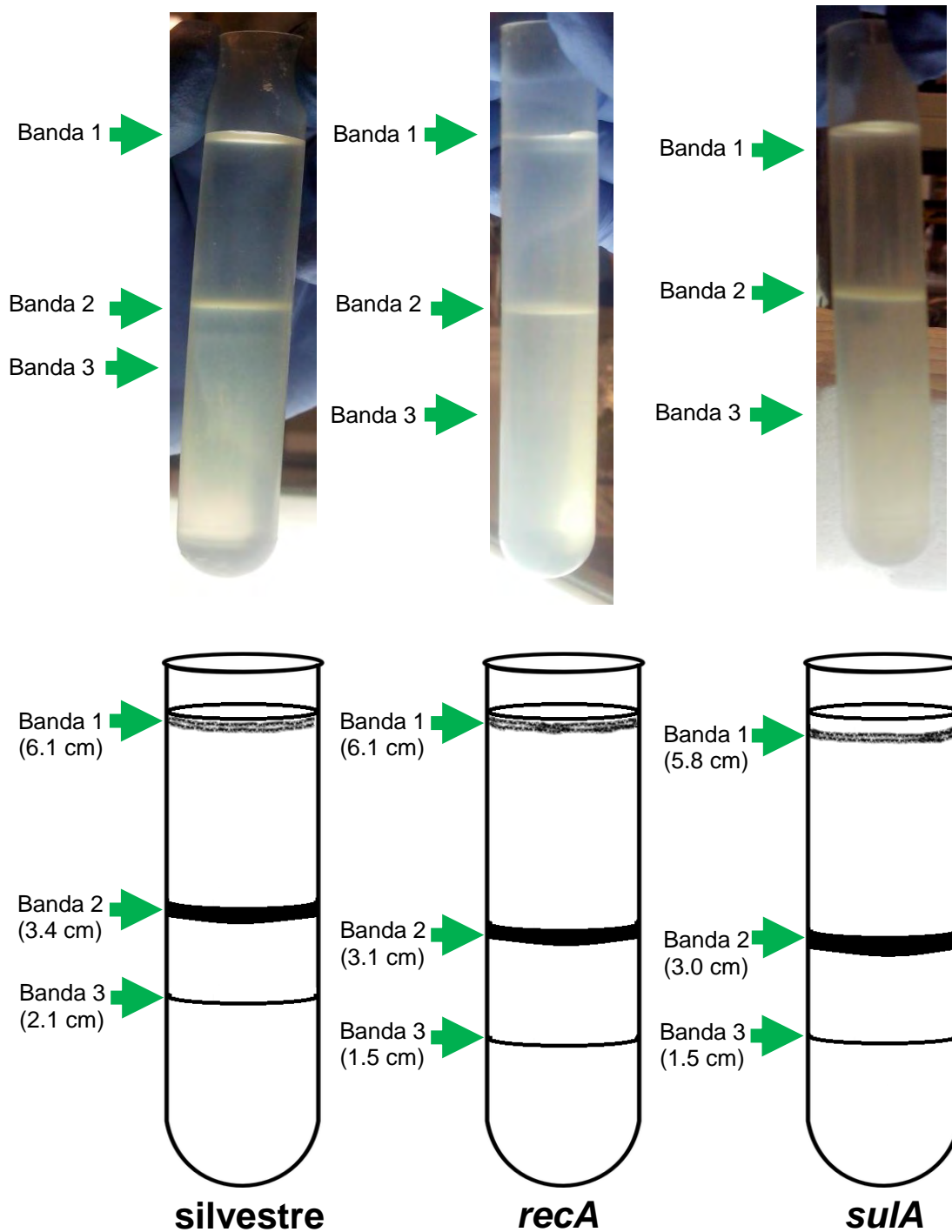


Figura 2. Gradientes de percoll de las cepas *silvestre*, *recA* y *sulA*. En el panel superior se observan las fotografías de los gradientes correspondientes a las cepas *silvestre*, *recA* y *sulA*. El panel inferior muestra una representación gráfica de las fotografías y se señala con una flecha la ubicación de cada subpoblación (banda) y su distancia del fondo del tubo a ésta entre paréntesis, el menisco se encuentra a 6.1 cm del tubo en todos los casos.

Tabla 1. Respuesta de las subpoblaciones de la cepa silvestre ante estrés por hiperosmolaridad, calor y pH ácido. Se hicieron comparaciones pareadas de las subpoblaciones, antes y después de someterlas a estrés, para ver si el estrés estaba funcionando. Para ello se utilizó la prueba T de Student, $\alpha=0.05$. La variable de respuesta que se evaluó fue viabilidad, los datos se muestran como UFC/mL. E=exponencial.

Cepa silvestre			
Estrés por calor			
	Sin estrés	Con estrés	Significancia de la prueba de T
Cultivo	3.49E+09 ± 2.76E+08	2.36E+09 ± 3.66E+08	No
Banda 1	1.68E+08 ± 2.33E+07	1.05E+08 ± 2.44E+07	No
Banda 2	1.56E+09 ± 1.64E+08	5.34E+08 ± 1.07E+08	Sí
Banda 3	9.53E+07 ± 1.34E+07	4.73E+07 ± 4.62E+06	Sí
Estrés por hiperosmolaridad			
Cultivo	3.49E+09 ± 2.76E+08	3.52E+09 ± 3.75E+08	No
Banda 1	1.33E+08 ± 1.60E+07	1.72E+08 ± 2.96E+07	No
Banda 2	4.98E+08 ± 1.75E+08	1.00E+09 ± 1.54E+08	Sí
Banda 3	4.27E+08 ± 1.58E+08	8.60E+07 ± 2.04E+07	No
Estrés por pH ácido			
Cultivo	3.49E+09 ± 2.94E+08	3.81E+09 ± 4.11E+08	No
Banda 1	1.97E+08 ± 1.94E+07	2.10E+08 ± 1.26E+07	No
Banda 2	8.13E+08 ± 2.69E+08	1.21E+09 ± 1.98E+08	No
Banda 3	4.27E+08 ± 1.59E+08	8.40E+07 ± 1.64E+07	No

Tabla 2. Respuesta de las subpoblaciones de la *sulA* ante estrés por hiperosmolaridad, calor y pH ácido.

Se hicieron comparaciones pareadas de las subpoblaciones, antes y después de someterlas a estrés, para ver si el estrés estaba funcionando. Para ello se utilizó la prueba T de Student, $\alpha=0.05$. La variable de respuesta que se evaluó fue viabilidad, los datos se muestran como UFC/mL. E=exponencial.

Cepa <i>sulA</i>			
Estrés por calor			
	Sin estrés	Con estrés	Significancia de la prueba de T
Cultivo	4.31E+09 ± 4.52E+08	3.55E+09 ± 2.65E+08	Sí
Banda 1	1.96E+08 ± 3.09E+07	1.21E+08 ± 2.76E+07	No
Banda 2	1.23E+09 ± 1.93E+08	9.47E+08 ± 2.13E+08	No
Banda 3	7.67E+07 ± 1.15E+07	1.18E+08 ± 1.61E+07	No
Estrés por hiperosmolaridad			
Cultivo	4.31E+09 ± 4.52E+08	4.32E+09 ± 4.03E+08	No
Banda 1	1.96E+08 ± 3.09E+07	1.41E+08 ± 1.85E+07	No
Banda 2	1.23E+09 ± 1.93E+08	1.71E+08 ± 1.97E+07	Sí
Banda 3	7.67E+07 ± 1.15E+07	3.86E+07 ± 4.51E+06	Sí
Estrés por pH ácido			
Cultivo	4.31E+09 ± 4.52E+08	3.27E+09 ± 3.82E+08	Sí
Banda 1	1.96E+08 ± 3.09E+07	1.50E+08 ± 2.29E+07	No
Banda 2	1.23E+09 ± 1.93E+08	2.21E+09 ± 1.71E+08	No
Banda 3	7.67E+07 ± 1.15E+07	8.93E+07 ± 1.94E+07	No

Tabla 3. Respuesta de las subpoblaciones de la cepa *recA* ante estrés por hiperosmolaridad, calor y pH ácido. Se hicieron comparaciones pareadas de las subpoblaciones, antes y después de someterlas a estrés, para ver si el estrés estaba funcionando. Para ello se utilizó la prueba T de Student, $\alpha=0.05$. La variable de respuesta que se evaluó fue viabilidad, los datos se muestran como UFC/mL. E=exponencial.

Cepa <i>recA</i>			
Estrés por calor			
	Sin estrés	Con estrés	Significancia de la prueba de T
Cultivo	2.33E+09 ± 1.64E+08	1.09E+09 ± 2.27E+08	Sí
Banda 1	9.13E+07 ± 1.26E+07	3.20E+07 ± 4.60E+06	No
Banda 2	2.85E+08 ± 2.50E+07	1.13E+08 ± 1.04E+07	Sí
Banda 3	1.98E+07 ± 2.44E+06	1.53E+07 ± 1.87E+06	No
Estrés por hiperosmolaridad			
Cultivo	2.33E+09 ± 1.64E+08	7.33E+08 ± 1.05E+08	Sí
Banda 1	9.13E+07 ± 1.15E+07	2.51E+07 ± 1.87E+06	No
Banda 2	2.85E+08 ± 2.50E+07	5.01E+07 ± 4.44E+06	Sí
Banda 3	1.98E+07 ± 2.44E+06	1.84E+07 ± 2.98E+06	No
Estrés por pH ácido			
Cultivo	2.33E+09 ± 1.64E+08	1.50E+09 ± 2.70E+08	Sí
Banda 1	9.13E+07 ± 1.15E+07	6.29E+07 ± 7.62E+06	No
Banda 2	2.85E+08 ± 1.64E+07	1.58E+08 ± 2.47E+07	Sí
Banda 3	1.98E+07 ± 2.44E+06	1.91E+07 ± 1.86E+06	No

Respuesta a diferentes tipos estrés de las subpoblaciones de la cepa silvestre

Estrés por hiperosmolaridad en la cepa silvestre

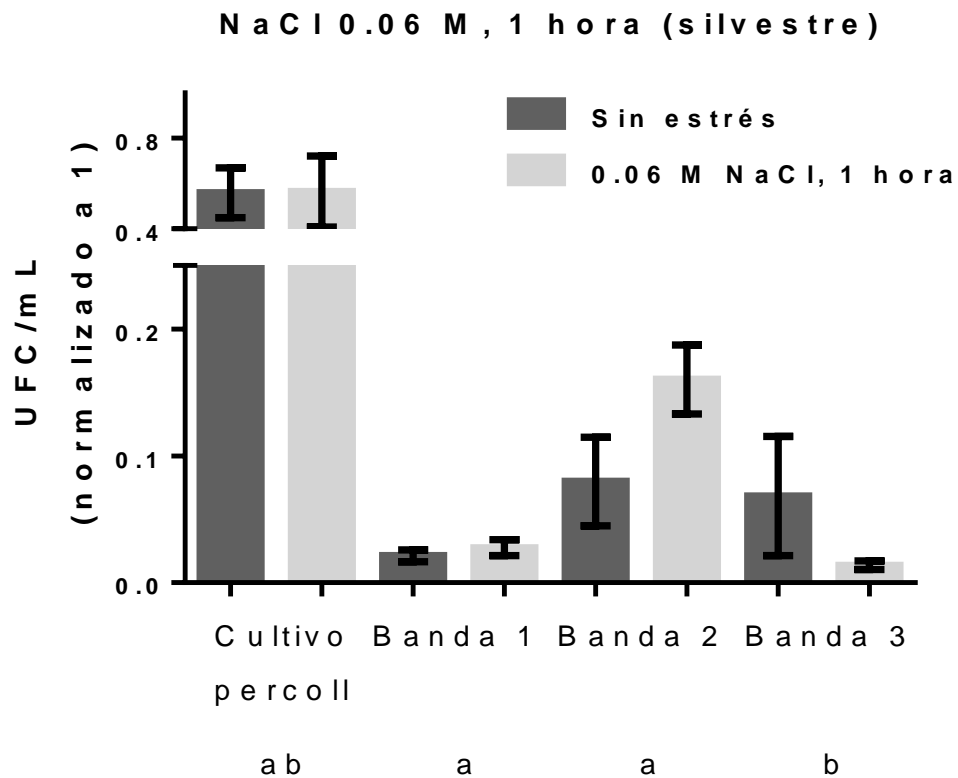


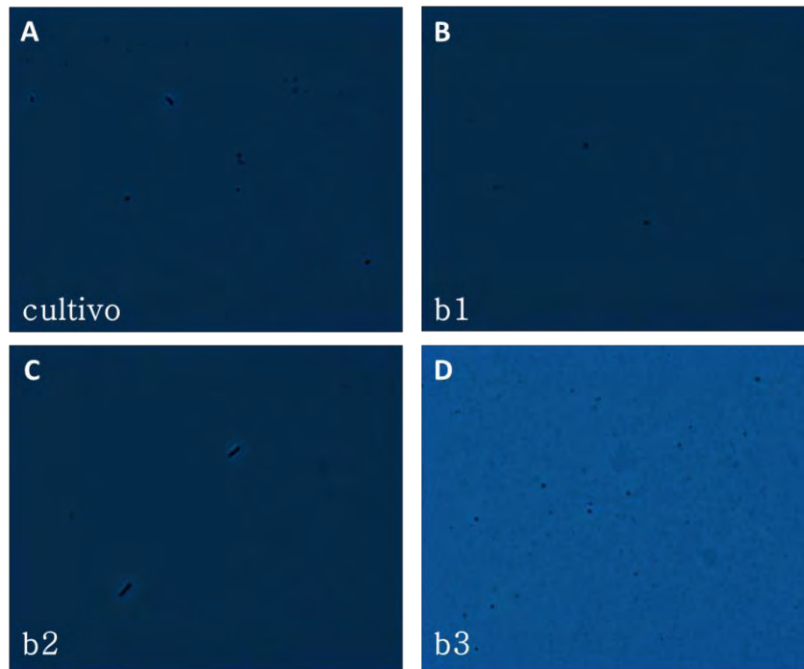
Figura 3. Respuesta de la cepa silvestre a estrés por hiperosmolaridad evaluada mediante cuenta viable. Se sometió a la cepa silvestre a una concentración de 0.06 M de NaCl durante una hora. Luego se hizo cuenta viable por goteo de las muestras sometidas a estrés y para ver en qué medida fueron afectadas se midió viabilidad de las células antes de ser tratadas. También se comparó el comportamiento de las subpoblaciones separadas a partir del gradiente con el del cultivo completo, que fue tratado de la misma manera que las bandas pero sin la centrifugación. Los datos están normalizados a 1 de acuerdo a la cuenta viable más alta que se obtuvo. Para el análisis estadístico se realizó ANOVA ($\alpha=0.05$) y la prueba *post hoc* de Tukey ($\alpha=0.05$), los datos ingresados a estas pruebas fue en forma de proporciones. Las subpoblaciones con la misma letra no son significativamente diferentes. En el apéndice se encuentra la información de esta gráfica en forma de proporciones y corresponde a la figura 1A.

El estrés por hiperosmolaridad con NaCl 0.6 M aplicado a la cepa silvestre durante 1 hora, afectó de manera diferente a las subpoblaciones. La banda 3 fue muy sensible al estrés, mientras que la banda 2 y la banda 1 aumentaron el tamaño de su población. La resistencia a este tipo de estrés puede deberse tanto al tipo de osmolitos de la bacteria como a la concentración de los mismos, es decir, que las bandas 1 y 2, pudieran tener osmolitos sin carga neta a una concentración elevada.

Una posible razón por la que la banda 1 y la banda 2 incrementaron el número de células, pudiera ser que el estrés además de que permitió que las células sobrevivieran, dejó que terminaran la replicación de las horquillas ya comenzadas, o bien desinhibió la división celular de los filamentos.

En la microscopía de contraste de fases de la cepa silvestre sometida a hiperosmolaridad (figura 4), observamos que la banda 2 es la que presenta bacterias con morfología diferente a las bandas 1, 2 y al cultivo sin separar, parece que está conformada por pequeños filamentos, o bien por células que se acaban de dividir. Aunque en las otras también hay este tipo de estructuras, en la banda 2 es más notorio, sin embargo, este tipo de estructura se mantiene después de aplicar el estrés, lo que podría sugerir que no es debido a los filamentos que el número de la población incrementa sino a que se permite la terminación de las horquillas de replicación ya continuadas, aunque para demostrarlo habría que hacer un análisis más cuidadoso.

Sin estrés



NaCl 0.06 M, 1 hora

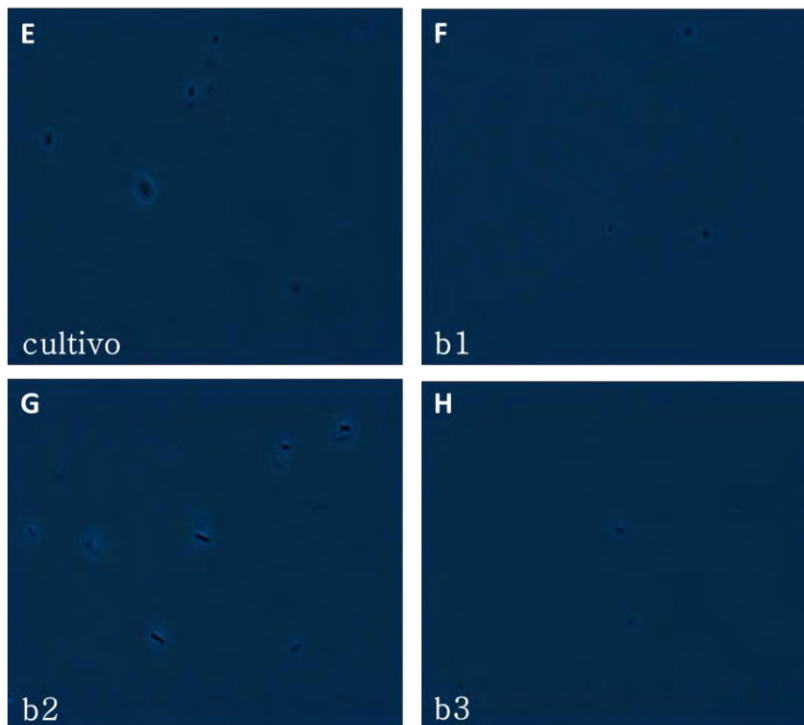


Figura 4. Microscopía de la cepa silvestre después de aplicar estrés por hiperosmolaridad. Las fotografías A-D permiten ver las muestras antes de ser sometidas al tratamiento de 0.06 M de NaCl durante 1 hora. Las imágenes E-H muestran a las células luego de ser estresadas. b1=banda 1, b2=banda 2, b3=banda 3.

Estrés por calor en la cepa silvestre

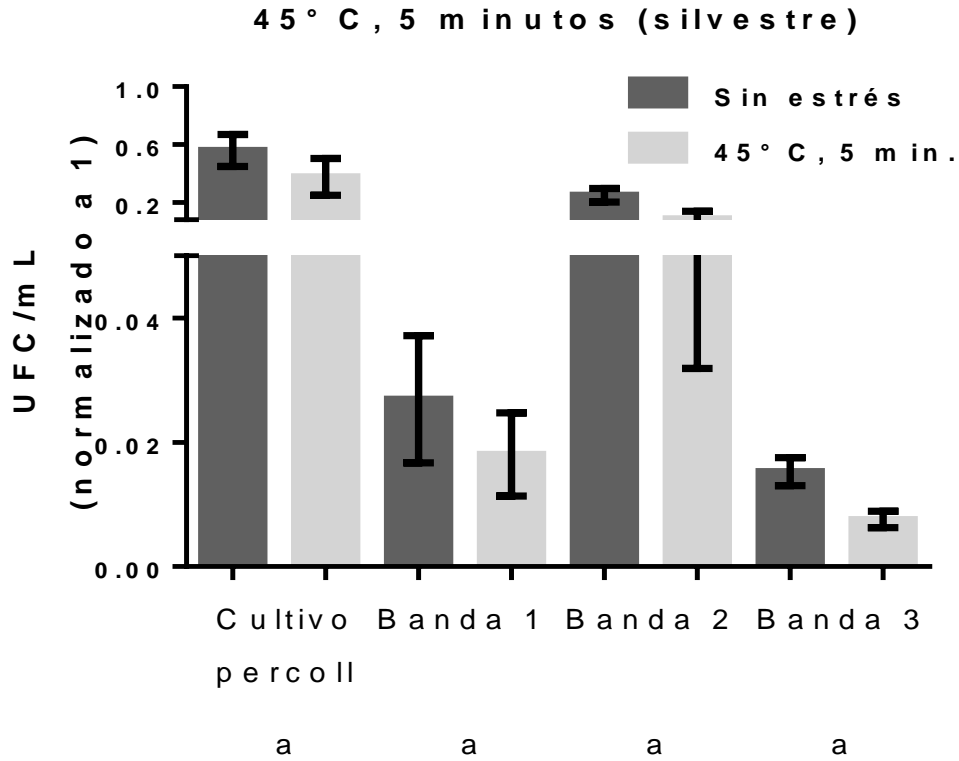
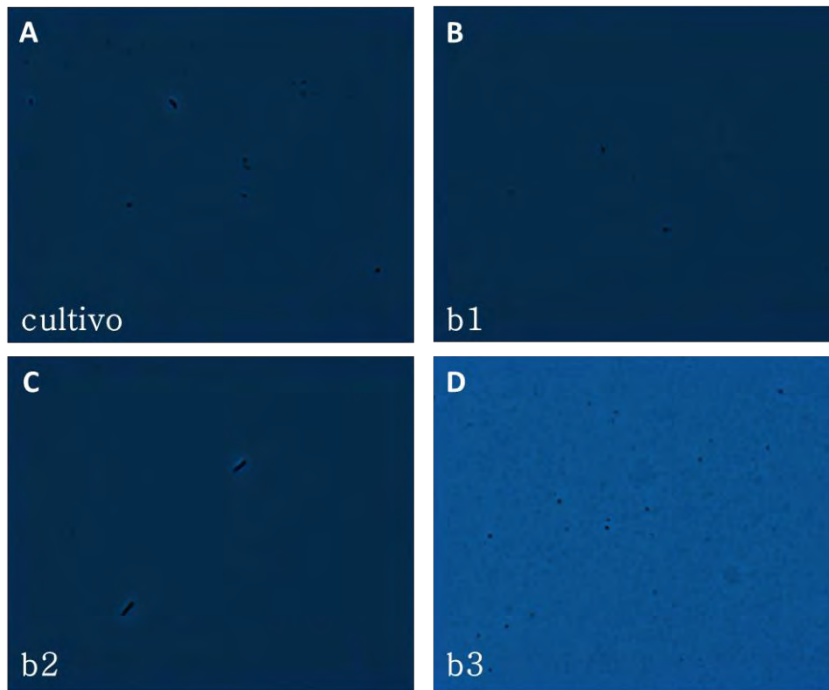


Figura 5. Respuesta de la cepa silvestre a estrés por calor evaluada mediante cuenta viable. Se sometió a la cepa silvestre a 45° C durante 5 minutos. Luego se hizo cuenta viable por goteo de las muestras sometidas a estrés y para ver en qué medida fueron afectadas se midió viabilidad de las células antes de ser tratadas. También se comparó el comportamiento de las subpoblaciones separadas a partir del gradiente con el del cultivo completo, que fue tratado de la misma manera que las bandas pero sin la centrifugación. Los datos están normalizados a 1 de acuerdo a la cuenta viable más alta que se obtuvo. Para el análisis estadístico se realizó ANOVA ($\alpha=0.05$) y la prueba *post hoc* de Tukey ($\alpha=0.05$), los datos ingresados a estas pruebas fue en forma de proporciones. Las subpoblaciones con la misma letra no son significativamente diferentes. En el apéndice se encuentra la información de esta gráfica en forma de proporciones y corresponde a la figura 2A.

A pesar de que el estrés por calor funcionó y disminuyó la población de manera significativa en todas las bandas, el calor aplicado afectó de igual manera a todas las subpoblaciones, y todas disminuyen su población significativamente (figura 5). Tal vez el estrés es demasiado fuerte para poder contender con él, se debería intentar el mismo tipo de estrés pero con menor intensidad, ya sea disminuyendo el tiempo de exposición o la temperatura. De esta manera podríamos ver si las bandas que muestran mayor resistencia al estrés hiperosmótico también presentan mayor resistencia al estrés por calor.

La microscopía de las muestras que fueran tratadas con calor, vuelve a presentar un patrón similar al del apartado anterior: la banda 2 forma filamentos, y éstos se mantienen después del estrés. En el caso de los otros grupos, también se observan filamentos pero con una frecuencia menor (figura 6).

Sin estrés



45° C, 5 minutos

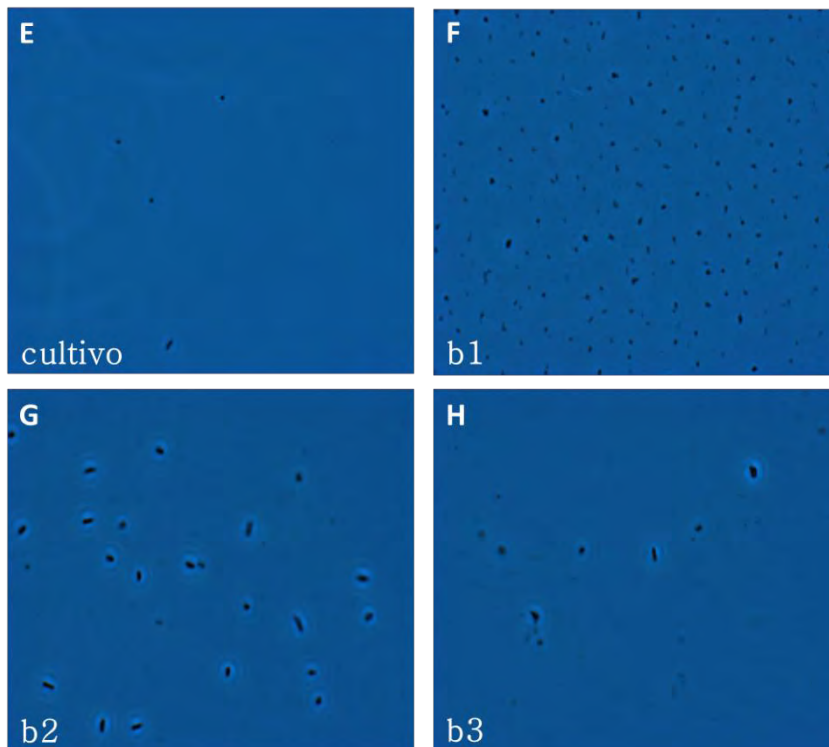


Figura 6. Microscopía de la cepa silvestre después de aplicar estrés por calor. Las fotografías A-D permiten ver las muestras antes de ser sometidas al tratamiento de los 45°C por 5 minutos. Las imágenes E-H muestran a las células luego de ser estresadas. b1=banda 1, b2=banda 2, b3=banda 3.

Estrés por pH ácido en la cepa silvestre

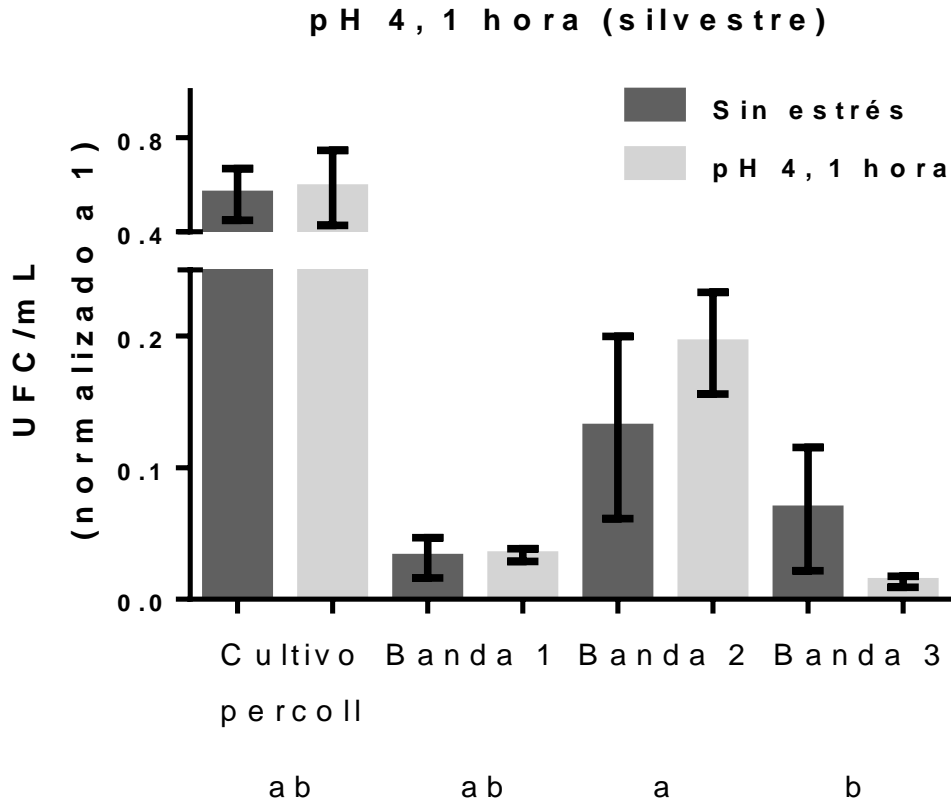
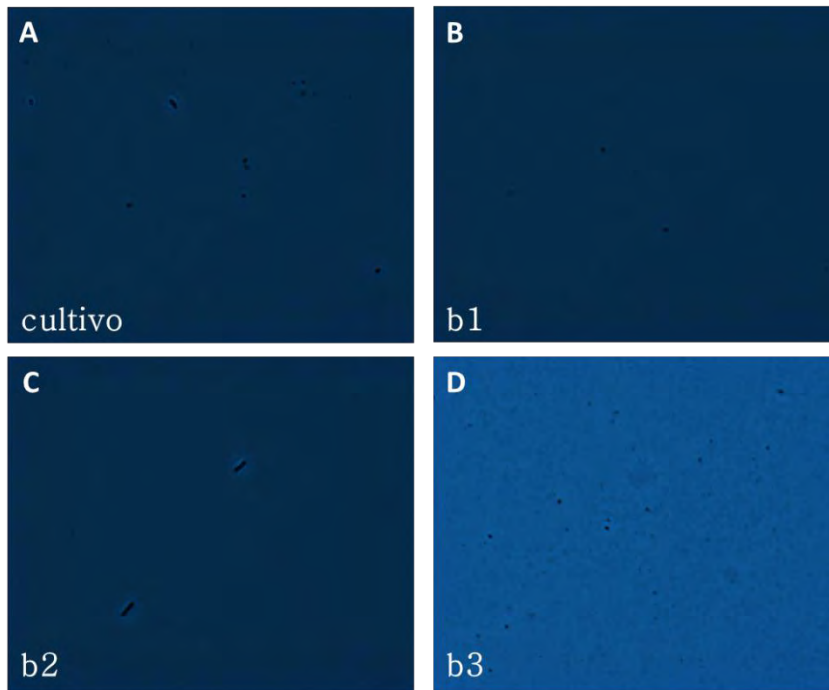


Figura 7. Respuesta de la cepa silvestre a estrés por pH ácido evaluada mediante cuenta viable. Se sometió a la cepa silvestre a pH 4 durante 1 hora. Luego se hizo cuenta viable por goteo de las muestras sometidas a estrés y para ver en qué medida fueron afectadas se midió viabilidad de las células antes de ser tratadas. También se comparó el comportamiento de las subpoblaciones separadas a partir del gradiente con el del cultivo completo, que fue tratado de la misma manera que las bandas pero sin la centrifugación. Los datos están normalizados a 1 de acuerdo a la cuenta viable más alta que se obtuvo. Para el análisis estadístico se realizó ANOVA ($\alpha=0.05$) y la prueba *post hoc* de Tukey ($\alpha=0.05$), los datos ingresados a estas pruebas fue en forma de proporciones. Las subpoblaciones con la misma letra no son significativamente diferentes. En el apéndice se encuentra la información de esta gráfica en forma de proporciones y corresponde a la figura 3A.

En el estrés por pH de la cepa silvestre la banda 2 y la banda 3 se comportaron de forma distinta ante este tipo de estrés, pues mientras la primera aumentó el número de células, la última lo disminuyó (figura 7). La banda 3 es la menos resistente a estrés por hiperosmolaridad y pH ácido, mientras que la banda 2 es más resistente al estrés por pH y a hiperosmolaridad, lo que pudiera sugerir que hay una vía compartida para responder a estos dos tipos de estrés como la síntesis de porinas OmpF y OmpR reguladas en el caso de hiperosmolaridad por el sistema de dos componentes EnvZ/OmpR y por CadC en el caso de pH ácido, ambas vías involucradas en la virulencia de *S. Typhimurium*.

En las imágenes obtenidas por microscopía, volvemos a observar que la banda 2 presenta estructuras de filamentos antes y después del estrés (figura 8).

Sin estrés



pH 4, 1 hora

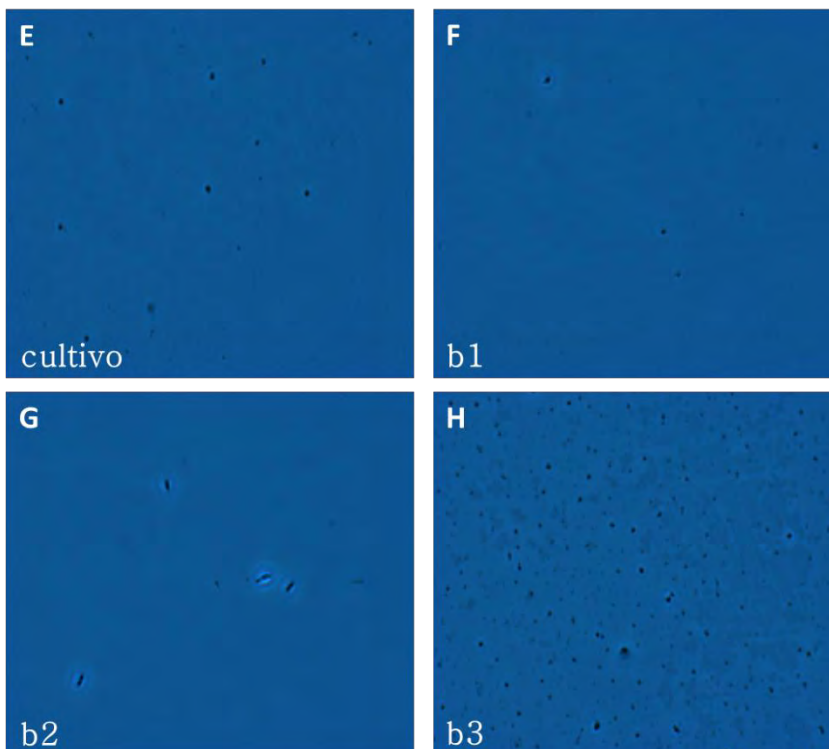


Figura 8. Microscopía de la cepa silvestre después de aplicar estrés por pH ácido. Las fotografías A-D permiten ver las muestras antes de ser sometidas al tratamiento de pH 4 durante una hora. Las imágenes E-H muestran a las células luego de ser estresadas. b1=banda 1, b2=banda 2, b3=banda 3.

Respuesta a diferentes tipos de estrés de las subpoblaciones de la cepa recA

Estrés por hiperosmolaridad de la cepa recA

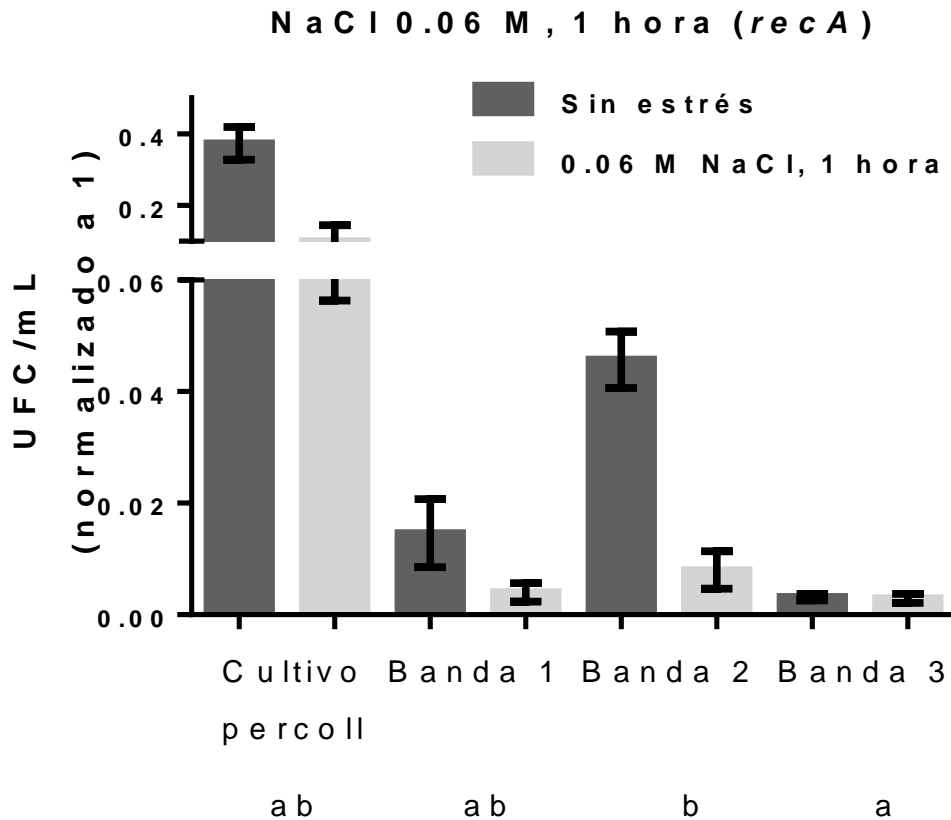


Figura 9. Respuesta de la cepa recA a estrés por hiperosmolaridad evaluada mediante cuenta viable. Se sometió a la cepa *recA* a una concentración 0.06 M de NaCl. Luego se hizo cuenta viable por goteo de las muestras sometidas a estrés y para ver en qué medida fueron afectadas se midió viabilidad de las células antes de ser tratadas. También se comparó el comportamiento de las subpoblaciones separadas a partir del gradiente con el del cultivo completo, que fue tratado de la misma manera que las bandas pero sin la centrifugación. Los datos están normalizados a 1 de acuerdo a la cuenta viable más alta que se obtuvo. Para el análisis estadístico se realizó ANOVA ($\alpha=0.05$) y la prueba *post hoc* de Tukey ($\alpha=0.05$), los datos ingresados a estas pruebas fue en forma de proporciones. Las subpoblaciones con la misma letra no son significativamente diferentes. En el apéndice se encuentra la información de esta gráfica en forma de proporciones y corresponde a la figura 4A.

Cuando la cepa *recA* se somete a estrés por hiperosmolaridad vemos que la banda 3 es más resistente y que su población casi no se ve afectada, mientras que la banda 2 cae drásticamente (figura 9). Estas bandas presentan un comportamiento totalmente opuesto en la cepa silvestre, pues en esta cepa la banda 2 es más resistente y la banda 3 es más sensible.

Estrés por calor a la cepa *recA*

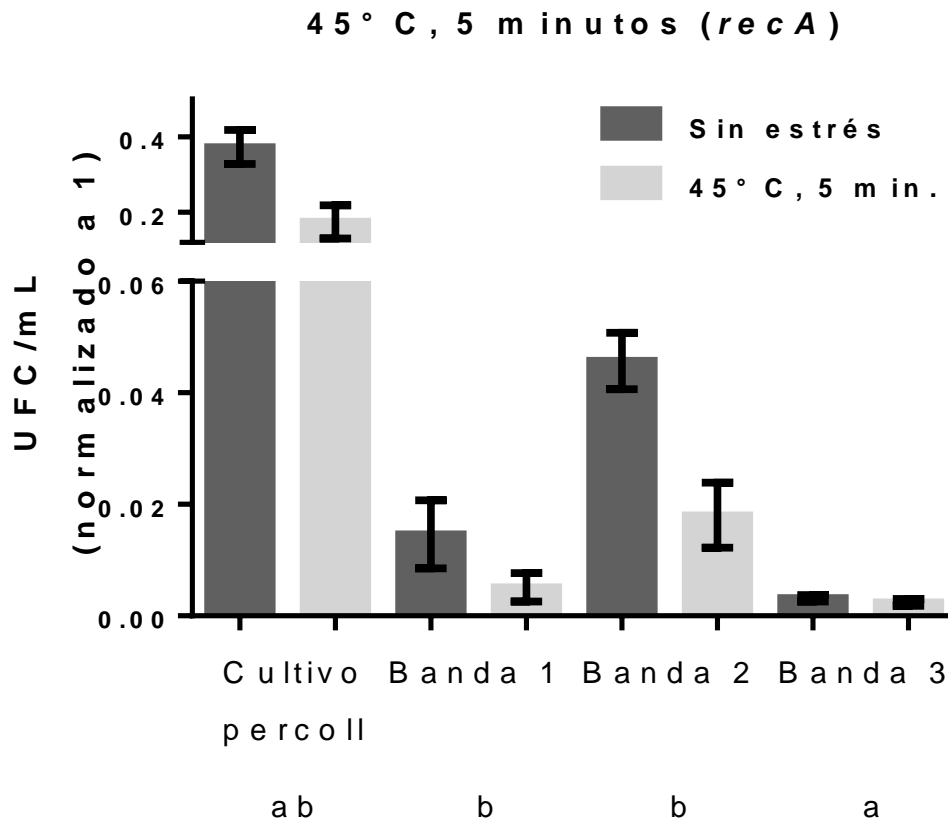


Figura 10. Respuesta de la cepa *recA* a estrés por calor evaluada mediante cuenta viable. Se sometió a la cepa *recA* a 45° C durante 5 minutos. Luego se hizo cuenta viable por goteo de las muestras sometidas a estrés y para ver en qué medida fueron afectadas se midió viabilidad de las células antes de ser tratadas. También se comparó el comportamiento de las subpoblaciones separadas a partir del gradiente con el del cultivo completo, que fue tratado de la misma manera que las bandas pero sin la centrifugación. Los datos están normalizados a 1 de acuerdo a la cuenta viable más alta que se obtuvo. Para el análisis estadístico se realizó ANOVA ($\alpha=0.05$) y la prueba *post hoc* de Tukey

($\alpha=0.05$), los datos ingresados a estas pruebas fue en forma de proporciones. Las subpoblaciones con la misma letra no son significativamente diferentes. En el apéndice se encuentra la información de esta gráfica en forma de proporciones y corresponde a la figura 5A.

A diferencia de la cepa silvestre donde no hubo diferencias en el comportamiento de las bandas con el estrés por calor, en la mutante *recA* tanto la banda 1 como la 2 disminuyeron su población, mientras que a la 3 no le afectó (figura 10). La banda 3 sometida a hiperosmolaridad tampoco se vio afectada, quizá porque el tipo de osmolitos y la concentración que posee de los mismos le dan resistencia al calor.

Estrés por pH ácido en la cepa *recA*

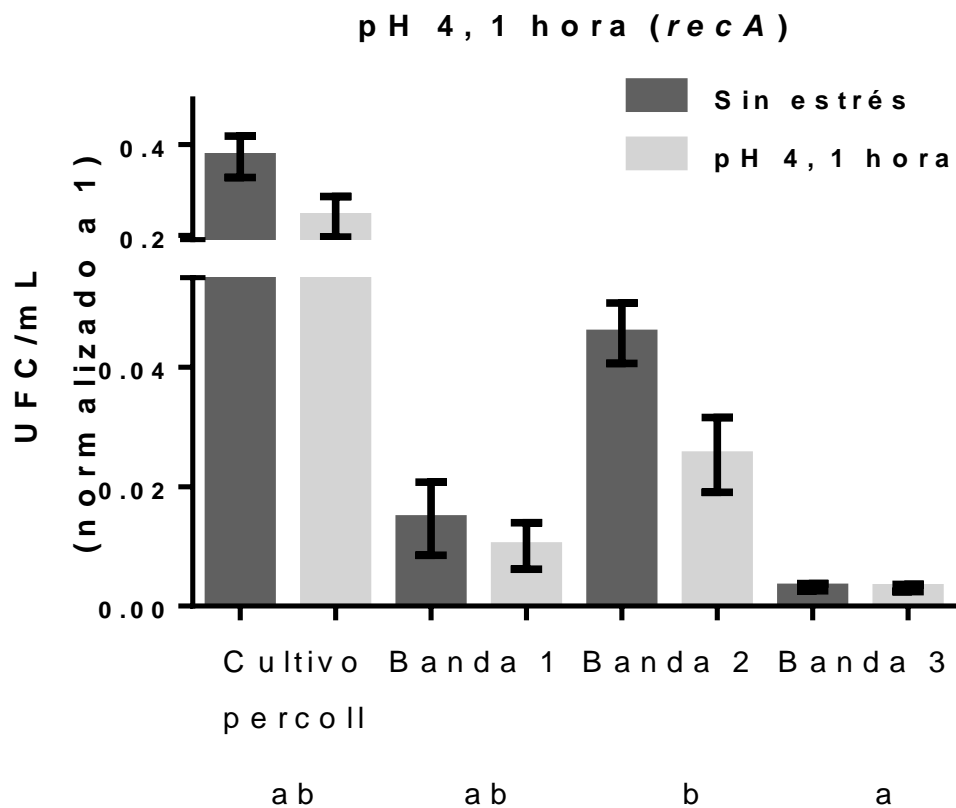


Figura 11. Respuesta de la cepa *recA* a estrés por pH ácido evaluada mediante cuenta viable. Se sometió a la cepa *recA* a pH 4 durante 1 hora. Luego se hizo cuenta viable por goteo de las muestras sometidas a estrés y para ver en qué medida fueron afectadas se midió viabilidad de las células antes de ser tratadas. También se comparó el comportamiento de las subpoblaciones separadas a partir del

gradiente con el del cultivo completo, que fue tratado de la misma manera que las bandas pero sin la centrifugación. Los datos están normalizados a 1 de acuerdo a la cuenta viable más alta que se obtuvo. Para el análisis estadístico se realizó ANOVA ($\alpha=0.05$) y la prueba post hoc de Tukey ($\alpha=0.05$), los datos ingresados a estas pruebas fue en forma de proporciones. Las subpoblaciones con la misma letra no son significativamente diferentes. En el apéndice se encuentra la información de esta gráfica en forma de proporciones y corresponde a la figura 6A.

Cuando la cepa *recA* se somete a estrés por pH, la banda 2 disminuye su población pero la banda 3 resiste (figura 11). La banda 3 de la cepa *recA* fue resistente a los tres tipos de estrés, mientras que la banda 2 fue sensible a todos ellos. Esto podría sugerirnos que aquí la respuesta a los tres tipos de estrés está compartiendo la misma vía, por ejemplo a través del sistema de dos componentes CpxA/CpxR o por σ^E , que se activan como respuesta a estrés extacitoplásmico. Pareciera que la ausencia de la función de *recA* en la banda 3 le estuviera dando algún tipo de resistencia. Quizá sea porque ya no se hace síntesis de translesión, lo cual reduce la mutagénesis, y bajo estas condiciones de estrés, esta opción pudiera ser la más benéfica para la bacteria.

Respuesta a diferentes tipos de estrés de las subpoblaciones de la cepa *sulA*

Estrés por hiperosmolaridad en la cepa *sulA*

Cuando se somete a la cepa *sulA* a un estrés de hiperosmolaridad, encontramos que la banda 2 es la subpoblación menos resistente a este tipo de estrés, mientras que a las demás subpoblaciones no les afecta (figura 12). La banda 2 era la que parecía tener filamentos en la cepa silvestre, quizá como estas células estaban dañadas y por eso su división celular se inhibió, cuando se les permite la división celular ante un estrés, estas células se hacen menos resistentes que si están en filamentos. Este resultado contrasta un poco con lo analizado en la figura 3, pues probablemente el aumento en el número de células después de aplicar el estrés en la cepa silvestre, pueda deberse a la formación de filamentos.

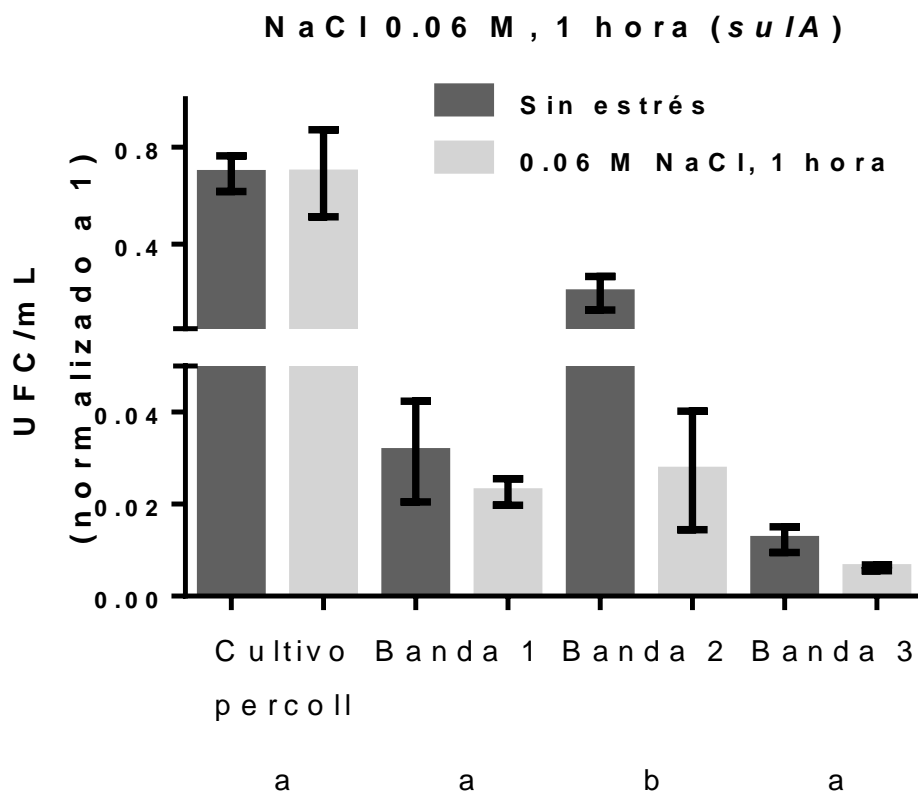


Figura 12. Respuesta de la cepa *sulA* a estrés por hiperosmolaridad evaluada mediante cuenta viable. Se sometió a la cepa *sulA* a una concentración 0.06 M de NaCl. Luego se hizo cuenta viable por goteo de las muestras sometidas a estrés y para ver en qué medida fueron afectadas se midió viabilidad de las células antes de ser tratadas. También se comparó el comportamiento de las subpoblaciones separadas a partir del gradiente con el del cultivo completo, que fue tratado de la misma manera que las bandas pero sin la centrifugación. Los datos están normalizados a 1 de acuerdo a la cuenta viable más alta que se obtuvo. Para el análisis estadístico se realizó ANOVA ($\alpha=0.05$) y la prueba *post hoc* de Tukey ($\alpha=0.05$), los datos ingresados a estas pruebas fue en forma de proporciones. Las subpoblaciones con la misma letra no son significativamente diferentes. En el apéndice se encuentra la información de esta gráfica en forma de proporciones y corresponde a la figura 7A.

Estrés por calor en la cepa *sulA*

Cuando se sometió a estrés por calor a la cepa *sulA* no se notaron diferencias en el comportamiento de las bandas (figura 13), aunque el estrés funcionó disminuyendo la población en las 4 muestras. Este comportamiento es semejante al de la cepa silvestre.

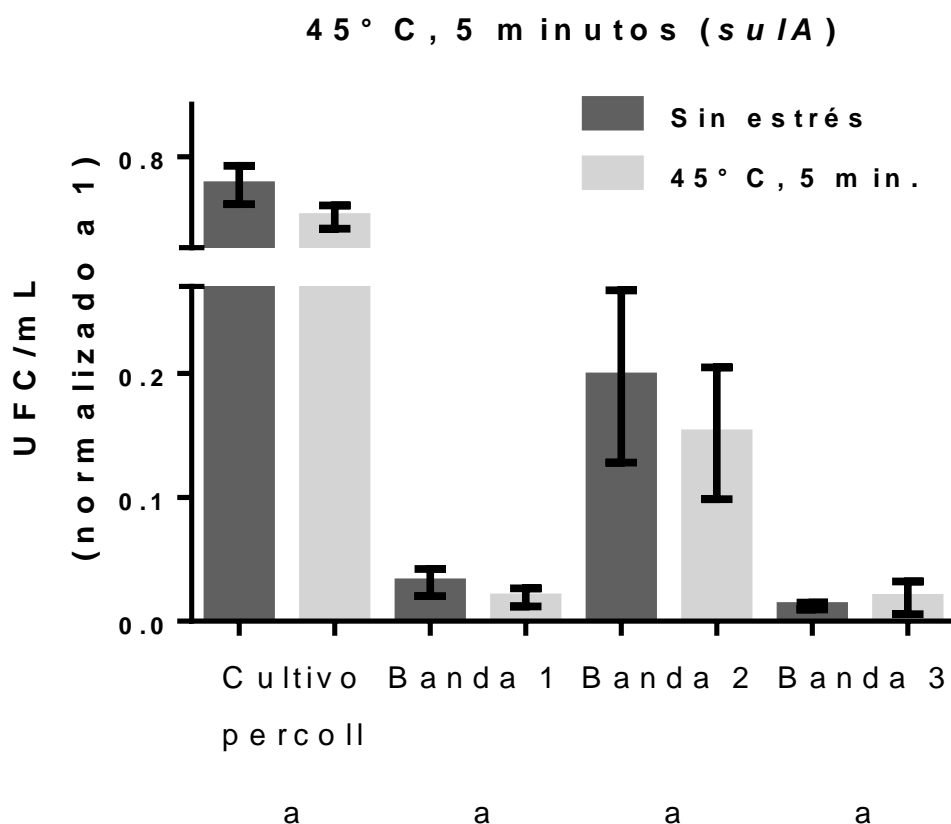


Figura 13. Respuesta de la cepa *sulA* a estrés por calor evaluada mediante cuenta viable. Se sometió a la cepa *sulA* a 45° C durante 5 minutos. Luego se hizo cuenta viable por goteo de las muestras sometidas a estrés y para ver en qué medida fueron afectadas se midió viabilidad de las células antes de ser tratadas. También se comparó el comportamiento de las subpoblaciones separadas a partir del gradiente con el del cultivo completo, que fue tratado de la misma manera que las bandas pero sin la centrifugación. Los datos están normalizados a 1 de acuerdo a la cuenta viable más alta que se obtuvo. Para el análisis estadístico se realizó ANOVA ($\alpha=0.05$) y la prueba *post hoc* de Tukey ($\alpha=0.05$), los datos ingresados a estas pruebas fue en forma de proporciones. Las subpoblaciones con la misma letra no son significativamente diferentes. En el apéndice se encuentra la información de esta gráfica en forma de proporciones y corresponde a la figura 8A.

Estrés por pH ácido en la cepa *sulA*

Cuando se somete a la cepa *sulA* a estrés por pH 4, se ve que la banda 1 y el cultivo se ven afectadas negativamente por el estrés, mientras que la banda 2 aumenta (figura 14). Esto es contrario a lo que pasó en esta cepa en la resistencia a hiperosmolaridad, pues en

este caso, la banda 2 se vio afectada negativamente, mientras que la banda 1 y el cultivo parecen ser resistentes al estrés. Esto sugiere que las vías por las que actúan son diferentes y que dependen de sus recursos genéticos para montar la respuesta, es decir, *sulA* y *recA*, podrían tener un efecto en cuanto a la respuesta a estrés.

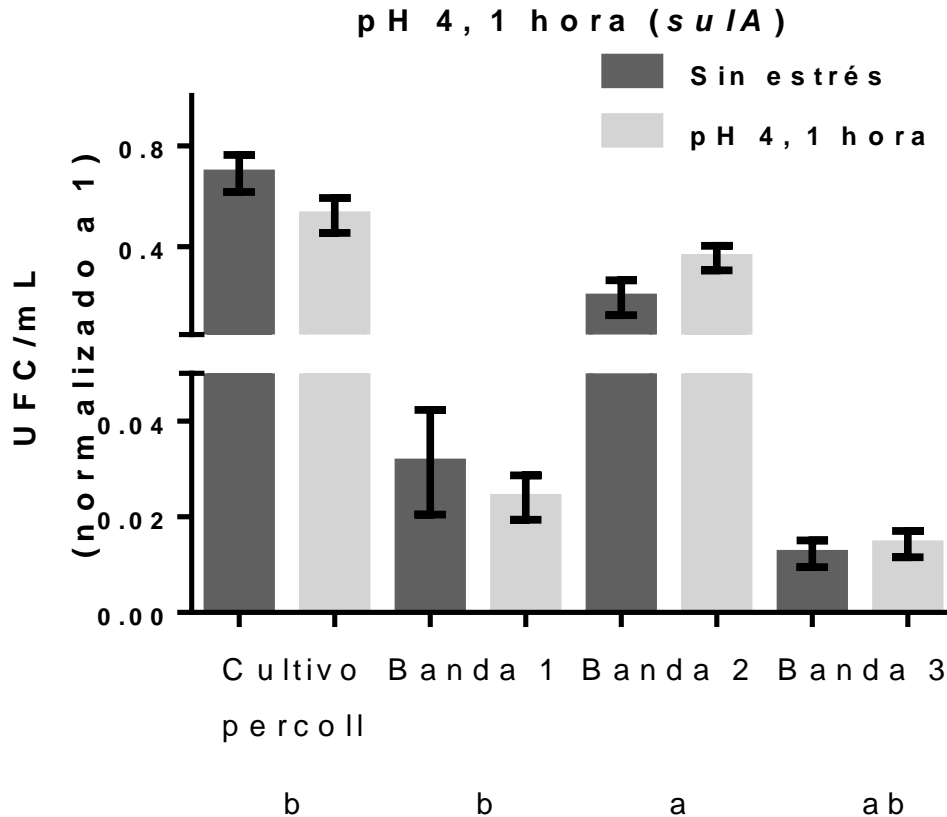


Figura 14. Respuesta de la cepa *sulA* a estrés por pH ácido evaluada mediante cuenta viable. Se sometió a la cepa *sulA* a pH 4 durante 1 hora. Luego se hizo cuenta viable por goteo de las muestras sometidas a estrés y para ver en qué medida fueron afectadas se midió viabilidad de las células antes de ser tratadas. También se comparó el comportamiento de las subpoblaciones separadas a partir del gradiente con el del cultivo completo, que fue tratado de la misma manera que las bandas pero sin la centrifugación. Los datos están normalizados a 1 de acuerdo a la cuenta viable más alta que se obtuvo. Para el análisis estadístico se realizó ANOVA ($\alpha=0.05$) y la prueba *post hoc* de Tukey ($\alpha=0.05$), los datos ingresados a estas pruebas fue en forma de proporciones. Las subpoblaciones con la misma letra no son significativamente diferentes. En el apéndice se encuentra la información de esta gráfica en forma de proporciones y corresponde a la figura 9A.

Respuesta de las cepas a diferentes tipos de estrés

En la tabla 4, se muestra la respuesta de cada una de las cepas ante todos los tipos de estrés que se utilizaron en este trabajo.

Tabla 4. Respuesta de las 3 cepas ante los tipos de estrés a los que fueron sometidas. Para determinar si las subpoblaciones de un cultivo de *Salmonella* se comportaban de manera distinta a cierto tipo de estrés se hizo el análisis estadístico de la proporción (UFC/mL después del estrés)/(UFC/mL antes del estrés) con ANOVA ($\alpha=0.05$) y la prueba *post hoc* Tuckey ($\alpha=0.05$). Las subpoblaciones con la misma letra no son significativamente diferentes. El símbolo (+) indica que la población aumentó después de que fue sometida a estrés, (-) que la población disminuyó luego de aplicar el estrés y (--) que la población se redujo en mayor grado que el caso anterior luego de aplicar el estrés.

	Silvestre	<i>recA</i>	<i>sulA</i>
Estrés por hiperosmolaridad			
Cultivo	ab (-)	ab (-)	a (-)
Banda 1	a (+)	ab (-)	a (-)
Banda 2	a (+)	b (--)	b (--)
Banda 3	b (-)	a (-)	a (-)
Estrés por calor			
Cultivo	a (-)	ab (-)	a (+)
Banda 1	a (-)	b (--)	a (-)
Banda 2	a (-)	b (--)	a (-)
Banda 3	a (-)	a (-)	a (-)
Estrés por pH ácido			
Cultivo	ab (+)	ab (-)	b (-)
Banda 1	ab (+)	ab (-)	b (-)
Banda 2	a (+)	b (--)	a (+)
Banda 3	b (-)	a (-)	ab (+)

De la tabla anterior, podemos decir que las subpoblaciones responden de manera diferente a estrés por hiperosmolaridad y pH ácido. En calor no observamos diferencias de comportamiento entre las subpoblaciones de un cultivo, tal vez porque el estrés es muy fuerte y afecta a todas de forma similar, lo cual podríamos confirmar bajando el tiempo o la temperatura de exposición.

La cepa *recA* es la menos resistente a los tres tipos de estrés, probablemente se deba a que RecA es la proteína encargada de detectar el daño a DNA, si no es sensible

porque la función no está presente en esta mutante, no genera una respuesta que proteja a la célula del daño ocasionado por el estrés.

Un resultado general en todas las gráficas es que donde hay mayor número de células es en el cultivo, lo cual indica que el tratamiento de centrifugación en percoll está matando a las bacterias o actuando como bacteriostático.

Otro aspecto que cabe recalcar es que no hay un comportamiento igual entre el cultivo y alguna de sus subpoblaciones, es decir, que el comportamiento del cultivo se debe a las interacciones entre las subpoblaciones, por lo que independientemente de que la banda 2 sea la que tenga el mayor número de células, requiere de la función de las otras subpoblaciones para tener el comportamiento que presenta el cultivo sin separar. En condiciones de estrés, alguna de las subpoblaciones del cultivo es la que mejor responde, lo que sugiere que la variabilidad de estados fisiológicos que hay proporciona una herramienta rápida de sobrevivencia a un tipo de estrés para la población, en comparación con el surgimiento de mutaciones.

Respuesta de las subpoblaciones a diferentes tipos de estrés

Para identificar si alguna subpoblación, independientemente de la cepa de la que proviniera, era más o menos resistente que las demás, se hizo un análisis estadístico que las comparara. La tabla 5 muestra los resultados.

De estos datos podemos decir que el cultivo sin separar y la banda 3 son las muestras menos resistentes a los tres tipos de estrés utilizados en este trabajo, y que la banda 2 es la más resistente, aunque no en todos los casos.

Tabla 5. Respuesta del cultivo sin separar y de sus 3 subpoblaciones ante los tipos de estrés a los que fueron sometidas. Para determinar si existían subpoblaciones con mayor o menor resistencia al estrés, se comparó el comportamiento de éstas con ANOVA ($\alpha=0.05$) y la prueba *pos hoc* Tuckey ($\alpha=0.05$). Las subpoblaciones con la misma letra no son significativamente diferentes. El símbolo (+) indica que la población aumento después de que fue sometida a estrés, (-) que la población disminuyó luego de aplicar el estrés y (--) que la población se redujo en mayor grado que el caso anterior luego de aplicar el estrés.

	Cultivo	Banda 1	Banda 2	Banda 3
Estrés por hiperosmolaridad				
Silvestre	a (-)	a (+)	a (+)	a (-)
<i>recA</i>	b (--)	b (-)	b (-)	a (-)
<i>sulA</i>	a (-)	ab (-)	b (-)	a (-)
Estrés por calor				
Silvestre	ab (-)	a (-)	a (-)	a (-)
<i>recA</i>	b (--)	a (-)	a (-)	a (-)
<i>sulA</i>	a (-)	a (-)	a (-)	a (+)
Estrés por pH ácido				
Silvestre	a (+)	a (+)	a (+)	b (-)
<i>recA</i>	b (-)	a (-)	b (-)	ab (-)
<i>sulA</i>	ab (-)	a (-)	a (+)	a (+)

CONCLUSIONES

Con estos experimentos se corrobora que algunas de las subpoblaciones de un cultivo en fase exponencial de *S. Typhimurium*, aisladas mediante el método de centrifugación en gradiente de percoll, tienen un estado fisiológico característico, lo cual observamos mediante una respuesta diferente a estrés entre ellas. Además, el comportamiento de las subpoblaciones difiere al del cultivo completo sin separar en subpoblaciones. Estos resultados no son dependientes de si la cepa es silvestre o mutante (*recA* y *sulA*).

En la cepa silvestre la banda 2 presentó una mayor resistencia a estrés por hiperosmolaridad y pH ácido que las demás. Mientras que la banda 3 y el cultivo sin separar fueron los más sensibles a estos tipos de estrés.

La cepa *recA* mostró resistencia en la banda 3 y sensibilidad en la banda 2 en todos los tipos de estrés.

La cepa *sulA* mostró mayor sensibilidad en la banda 2 en cuanto su respuesta a hiperosmolaridad, pero mayor resistencia de esta banda en el caso de estrés por pH ácido.

PERSPECTIVAS

1. Aumentar el número de repeticiones de los experimentos para lograr observaciones con mayor robustez estadística, ya que se trató de una aproximación que permitió observar tendencias, sin alcanzar los requerimientos estadísticos necesarios en algunos casos.
2. Para determinar si la disminución en la viabilidad después del tratamiento por centrifugación en percoll se debe a que las células mueren o a un efecto bacteriostático, se requiere llevar a cabo ensayos de actividad metabólica.
3. Emplear el método de separación por percoll para enriquecer poblaciones resistentes a determinado tipo de estrés e identificar los factores que le conceden este fenotipo.

BIBLIOGRAFÍA

- Akerlund, T., Nordstrom, K., y Bernander, R. (1995). Analysis of cell size and DNA content in exponentially growing and stationary-phase batch cultures of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 177(23), 6791–6797.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., y Stahl, D. A. (2015). *Brock. Biology of microorganisms*. (14va Ed.). Upper Saddle River, New Jersey, EUA: Prentice Hall.
- Dwek, R. D., Kobrin, L. H., Grossman, N., y Ron, E. Z. (1980). Synchronization of cell division in microorganisms by percoll gradients. *Journal of Bacteriology*, 144(1), 17–21.
- Erickson, H. P., Anderson, D. E., y Osawa, M. (2010). FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(4), 504–528.
- Gutknecht, J. y Walter, A. (1981). Transport of protons and hydrochloric acid through lipid bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 641, 183–188.
- Kim, B.H. y Gadd, G.M. (2008). *Bacterial physiology and metabolism*. (1ra Ed.) New York, EUA: Cambridge University Press.
- Koch, A. L. (1993). Biomass growth rate during the prokaryote cell cycle. *Critical Reviews in Microbiology*, 19(1), 17–42.
- Kruse, E., Uehlein, N., & Kaldenhoff, R. (2006). The aquaporins. *Genome Biology*, 7(2), 206.
- Laurent, T. C., Pertoft, H., y Nordli, O. (1980). Physical chemical characterization of percoll. I. Particle weight of the colloid. *Journal of Colloid and Interface Science*, 76(1), 124–132.
- Laurent, T. C., Ogston, A. G., Pertoft, H., y Carlsson, B. (1980). Physical chemical characterization of percoll. II. Size and interaction of colloidal particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 76(1), 133–141.
- Laurent, T. C., y Pertoft, H. (1980). Physical chemical characterization of percoll. III. Sodium binding. *Journal of Colloid and Interface Science*, 76(1), 142–145.
- Lee, Y. H., Kim, B. H., Kim, J. H., Yoon, W. S., Bang, S. H. y Park, Y. K. (2007). CadC has a global translational effect during acid adaptation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 189, 2417–2425.
- Lin, J., Lee, I. S., Frey, J., Slonczewski, J. L. y Foster, J. W. (1995). Comparative analysis of extreme acid survival in *S. Typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 177, 4097–4104.
- Lund, P., Tramonti, A., y De Biase, D. (2014). Coping with low pH: molecular strategies in neutralophilic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(6), 1091–1125.
- Makinoshima, H., Nishimura, A., e Ishihama, A. (2002). Fractionation of *Escherichia coli* cell populations at different stages during growth transition to stationary phase. *Molecular microbiology*, 43(2), 269–279.

- Makinoshima, H., Aizawa, S., Hayashi, H., Miki, T., Nishimura, A., e Ishihama, A. (2003). Growth phase-coupled alterations in cell structure and function of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 185(4), 1338–1345.
- Navarro Llorens, J. M., Tormo, A., & Martínez-García, E. (2010). Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), 476–495.
- Neidhardt, F.C. *et al.* (1996). *Escherichia Coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. (2da Ed.). Washington, D.C., EUA: American Society for Microbiology.
- Moat, A. G., Foster J. W., y Spector, M. P. (2002). *Microbial physiology*. (4ta Ed.) New York, EUA: Wiley-Liss.
- Prost, L. R., Daley, M. E., Le Sage, V., Bader, M. W., Le Moual, H., Klevit, R. E. y Miller, S. I. (2007). Activation of the bacterial sensor kinase PhoQ by acidic pH. *Molecular Cell*, 26, 165–174.
- Putzer, K. P., Buchholz, L. A., Lidstrom, M. E., y Remsen, C. C. (1991). Separation of methanotrophic bacteria by using Percoll and its application to isolation of mixed and pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(12), 3656–3659.
- Snyder, L., Peters, J. E., Henkin, T. M., y Champness, W. (2013). *Molecular genetics of bacteria*. (4ta Ed.) Washington DC, EUA: ASM Press.
- Schaechter, M., MaalOe, O., y Kjeldgaard, N. O. (1958). Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. *Journal of General Microbiology*, 19(3), 592–606.
- Sleator, R. D., y Hill, C. (2002). Bacterial osmoadaptation: The role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(1), 49–71.
- Stress response in bacteria. Sin fecha. Recuperado de https://www.sbi.uni-rostock.de/uploads/tx_templavoila/SBI_Courses_Bacterial-Stress-Response.pdf
- 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.

APÉNDICE

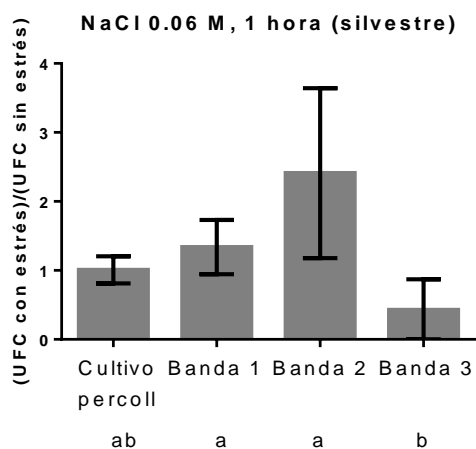


Figura 1A. Respuesta de la cepa silvestre a estrés por hiperosmolaridad, evaluada mediante cuenta viable y representada como $(UFC \text{ con estrés})/(UFC \text{ sin estrés})$. Se sometió a la cepa silvestre a una concentración de 0.06 M de NaCl durante una hora. Luego se hizo cuenta viable por goteo de las muestras sometidas a estrés y para ver en qué medida fueron afectadas se midió viabilidad de las células antes de ser tratadas. También se comparó el comportamiento de las subpoblaciones separadas a partir del gradiente con el del cultivo completo, que fue tratado de la misma manera que las bandas pero sin la centrifugación. Los datos están representados en forma de proporciones, es decir, en $(UFC \text{ con estrés})/(UFC \text{ sin estrés})$. Para el análisis estadístico se realizó ANOVA ($\alpha=0.05$) y la prueba post hoc de Tukey ($\alpha=0.05$) Las subpoblaciones con la misma letra no son significativamente diferentes.

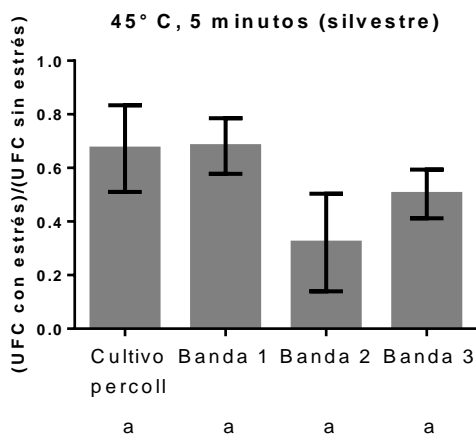


Figura 2A. Respuesta de la cepa silvestre a estrés por calor, evaluada mediante cuenta viable y representada como $(UFC \text{ con estrés})/(UFC \text{ sin estrés})$. Se sometió a la cepa silvestre a 45° C durante 5 minutos. Luego se hizo cuenta viable por goteo de las muestras sometidas a estrés y para ver en qué medida fueron afectadas se midió viabilidad de las células antes de ser tratadas. También se comparó el comportamiento de las subpoblaciones separadas a partir del gradiente con el del cultivo completo, que fue tratado de la misma manera que las bandas pero sin la centrifugación. Los datos están representados en forma de proporciones, es decir, en $(UFC \text{ con estrés})/(UFC \text{ sin estrés})$. Para el análisis estadístico se realizó ANOVA ($\alpha=0.05$) y la prueba post hoc de Tukey ($\alpha=0.05$) Las subpoblaciones con la misma letra no son significativamente diferentes.

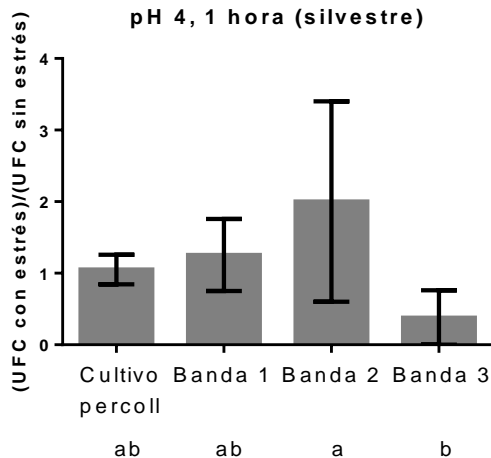


Figura 3A. Respuesta de la cepa silvestre a estrés por pH ácido, evaluada mediante cuenta viable y representada como (UFC con estrés)/(UFC sin estrés). Se sometió a la cepa silvestre a pH 4 durante 1 hora. Luego se hizo cuenta viable por goteo de las muestras sometidas a estrés y para ver en qué medida fueron afectadas se midió viabilidad de las células antes de ser tratadas. También se comparó el comportamiento de las subpoblaciones separadas a partir del gradiente con el del cultivo completo, que fue tratado de la misma manera que las bandas pero sin la centrifugación. Los datos están representados en forma de proporciones, es decir, en (UFC con estrés)/(UFC sin estrés). Para el análisis estadístico se realizó ANOVA ($\alpha=0.05$) y la prueba post hoc de Tukey ($\alpha=0.05$). Las subpoblaciones con la misma letra no son significativamente diferentes.

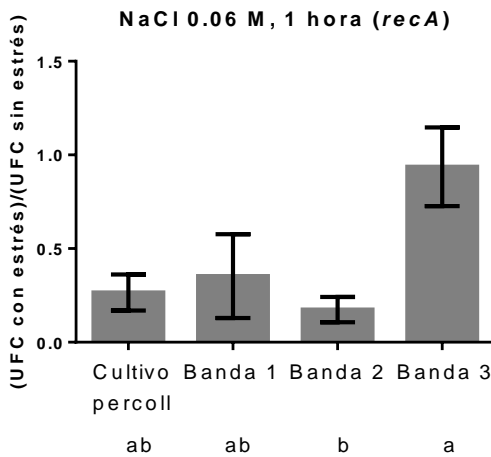


Figura 4A. Respuesta de la cepa *recA* a estrés por hiperosmolaridad, evaluada mediante cuenta viable y representada como (UFC con estrés)/(UFC sin estrés). Se sometió a la cepa *recA* a una concentración 0.6 M de NaCl durante 1 hora. Luego se hizo cuenta viable por goteo de las muestras sometidas a estrés y para ver en qué medida fueron afectadas se midió viabilidad de las células antes de ser tratadas. También se comparó el comportamiento de las subpoblaciones separadas a partir del gradiente con el del cultivo completo, que fue tratado de la misma manera que las bandas pero sin la centrifugación. Los datos están representados en forma de proporciones, es decir, en (UFC con estrés)/(UFC sin estrés). Para el análisis estadístico se realizó ANOVA ($\alpha=0.05$) y la prueba post hoc de Tukey ($\alpha=0.05$). Las subpoblaciones con la misma letra no son significativamente diferentes.

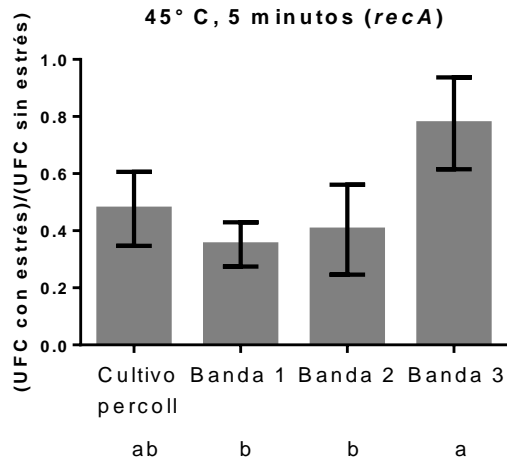


Figura 5A. Respuesta de la cepa *recA* a estrés por calor, evaluada mediante cuenta viable y representada como (UFC con estrés)/(UFC sin estrés). Se sometió a la cepa *recA* a una temperatura de 45° C durante 1 hora. Luego se hizo cuenta viable por goteo de las muestras sometidas a estrés y para ver en qué medida fueron afectadas se midió viabilidad de las células antes de ser tratadas. También se comparó el comportamiento de las subpoblaciones separadas a partir del gradiente con el del cultivo completo, que fue tratado de la misma manera que las bandas pero sin la centrifugación. Los datos están representados en forma de proporciones, es decir, en (UFC con estrés)/(UFC sin estrés). Para el análisis estadístico se realizó ANOVA ($\alpha=0.05$) y la prueba post hoc de Tukey ($\alpha=0.05$) Las subpoblaciones con la misma letra no son significativamente diferentes.

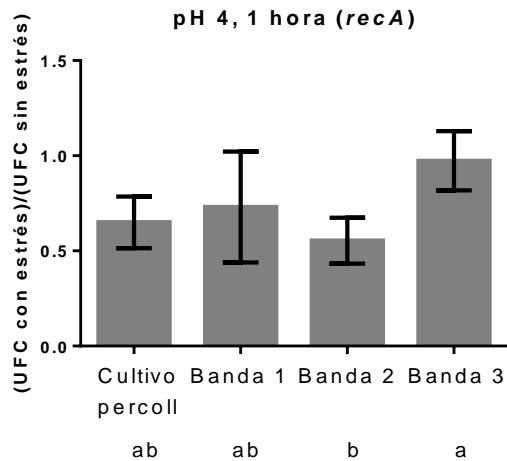


Figura 6A. Respuesta de la cepa *recA* a estrés por pH ácido, evaluada mediante cuenta viable y representada como (UFC con estrés)/(UFC sin estrés). Se sometió a la cepa *recA* a pH 4 durante 1 hora. Luego se hizo cuenta viable por goteo de las muestras sometidas a estrés y para ver en qué medida fueron afectadas se midió viabilidad de las células antes de ser tratadas. También se comparó el comportamiento de las subpoblaciones separadas a partir del gradiente con el del cultivo completo, que fue tratado de la misma manera que las bandas pero sin la centrifugación. Los datos están representados en forma de proporciones, es decir, en (UFC con estrés)/(UFC sin estrés). Para el análisis estadístico se realizó ANOVA ($\alpha=0.05$) y la prueba post hoc de Tukey ($\alpha=0.05$) Las subpoblaciones con la misma letra no son significativamente diferentes.

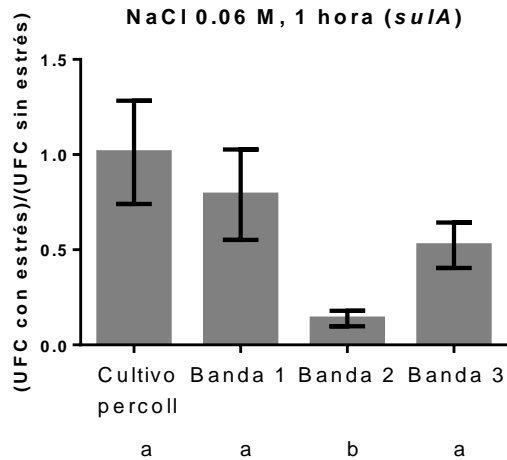


Figura 7A. Respuesta de la cepa *suIA* a estrés por hiperosmolaridad, evaluada mediante cuenta viable y representada como (UFC con estrés)/(UFC sin estrés). Se sometió a la cepa *suIA* a una concentración de 0.6 M de NaCl durante 1 hora. Luego se hizo cuenta viable por goteo de las muestras sometidas a estrés y para ver en qué medida fueron afectadas se midió viabilidad de las células antes de ser tratadas. También se comparó el comportamiento de las subpoblaciones separadas a partir del gradiente con el del cultivo completo, que fue tratado de la misma manera que las bandas pero sin la centrifugación. Los datos están representados en forma de proporciones, es decir, en (UFC con estrés)/(UFC sin estrés). Para el análisis estadístico se realizó ANOVA ($\alpha=0.05$) y la prueba post hoc de Tukey ($\alpha=0.05$) Las subpoblaciones con la misma letra no son significativamente diferentes.

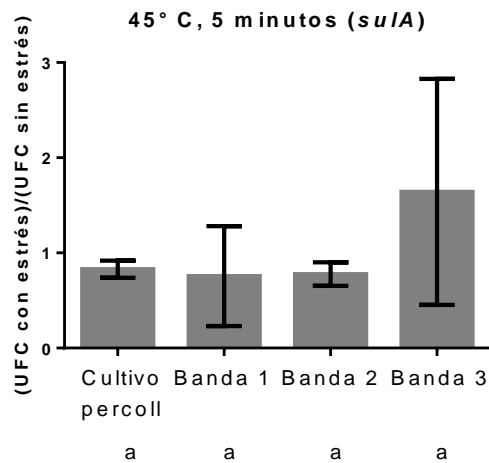


Figura 8A. Respuesta de la cepa *suIA* a estrés por hiperosmolaridad, evaluada mediante cuenta viable y representada como (UFC con estrés)/(UFC sin estrés). Se sometió a la cepa *suIA* a una concentración de 0.6 M de NaCl durante 1 hora. Luego se hizo cuenta viable por goteo de las muestras sometidas a estrés y para ver en qué medida fueron afectadas se midió viabilidad de las células antes de ser tratadas. También se comparó el comportamiento de las subpoblaciones separadas a partir del gradiente con el del cultivo completo, que fue tratado de la misma manera que las bandas pero sin la centrifugación. Los datos están representados en forma de proporciones, es decir, en (UFC con estrés)/(UFC sin estrés). Para el análisis estadístico se realizó ANOVA ($\alpha=0.05$) y la prueba post hoc de Tukey ($\alpha=0.05$) Las subpoblaciones con la misma letra no son significativamente diferentes.

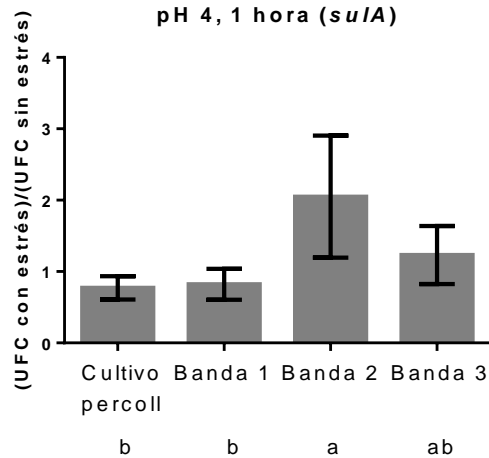


Figura 9A. Respuesta de la cepa *suIA* a estrés por hiperosmolaridad, evaluada mediante cuenta viable y representada como (UFC con estrés)/(UFC sin estrés). Se sometió a la cepa *suIA* a una concentración de 0.6 M de NaCl durante 1 hora. Luego se hizo cuenta viable por goteo de las muestras sometidas a estrés y para ver en qué medida fueron afectadas se midió viabilidad de las células antes de ser tratadas. También se comparó el comportamiento de las subpoblaciones separadas a partir del gradiente con el del cultivo completo, que fue tratado de la misma manera que las bandas pero sin la centrifugación. Los datos están representados en forma de proporciones, es decir, en (UFC con estrés)/(UFC sin estrés). Para el análisis estadístico se realizó ANOVA ($\alpha=0.05$) y la prueba post hoc de Tukey ($\alpha=0.05$) Las subpoblaciones con la misma letra no son significativamente diferentes.