



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

Mecanismos de resistencia de Salmonella al medio ácido

Resistance mechanisms of Salmonella to acidic environments

Autor/es

Daniel Rodrigo Latorre

Director/es

Guillermo Cebrián Auré  
Silvia Calero Martínez

Facultad de Veterinaria

2026

# ÍNDICE

I. Resumen.....	3
II. Summary .....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Características del género <i>Salmonella</i> .....	5
1.1.1. Importancia de <i>Salmonella</i> como patógeno alimentario.....	6
1.2. El pH ácido como agente de control en la cadena alimentaria.....	6
1.2.1. Ácidos orgánicos: alimentos ácidos y aditivos alimentarios/desinfectantes.....	7
1.3. Mecanismos de resistencia de <i>Salmonella</i> frente al estrés.....	8
1.3.1. Sistemas relacionados con la tolerancia al ácido.....	10
1.4. Estudios de los mecanismos de resistencia: la función de genes.....	12
1.4.1. Colección de mutantes de <i>Salmonella</i> del profesor McClelland.....	12
1.4.2. Herramientas bioinformáticas para el análisis funcional.....	13
1.5. Non-coding RNA (ncRNA).....	14
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	16
3. METODOLOGÍA .....	17
3.1. Microorganismos empleados.....	17
3.1.1. Selección de cepas con deleciones en genes relacionados con la resistencia al medio ácido en <i>Salmonella</i> .....	17
3.2. Medios de cultivo .....	18
3.3. Obtención de cultivos .....	19
3.5. Obtención de curvas de crecimiento.....	21
3.6. Ensayos de inactivación en medio ácido.....	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	23
4.1. Identificación de potenciales genes relevantes para la resistencia al medio ácido.....	23
4.2. Validación de la identidad de los mutantes mediante PCR .....	24
4.3. Capacidad de crecimiento en medio ácido .....	26
4.4. Capacidad de supervivencia al medio ácido .....	28
5. CONCLUSIONES .....	31
CONCLUSIONS .....	31
6. VALORACIÓN PERSONAL.....	32
7. BIBLIOGRAFÍA.....	33
ANEXO.....	37

## I. Resumen

*Salmonella enterica* es un patógeno alimentario de gran relevancia por su capacidad para sobrevivir en entornos adversos, incluida la exposición a condiciones ácidas como las presentes en alimentos o el tracto gastrointestinal humano. Aunque los mecanismos generales de tolerancia al ácido han sido descritos, aún no se conocen con detalle los genes concretos implicados en esta adaptación. El objetivo de este Trabajo Fin de Grado fue identificar y evaluar genes que puedan estar implicados en la resistencia al medio ácido mediante un enfoque de predicción bioinformática combinado con el análisis experimental.

A partir de una revisión bibliográfica y el uso de la herramienta STRING, se creó una red de interacción proteína-proteína que permitió identificar genes candidatos, entre ellos tres RNA no codificantes. Los correspondientes mutantes isogénicos en *Salmonella* Typhimurium 14028s se validaron mediante PCR para confirmar la correcta inserción de los cassetes de resistencia en cada gen.

Posteriormente se evaluó el crecimiento de la cepa parental y de los mutantes en medios LB y TSB acidificados. A pH 4,0 no se observó crecimiento en ninguna de las cepas, mientras que a pH 4,5 y 5,0 se pudieron detectar diferencias, siendo la cepa parental la que mostró un mayor crecimiento. Además, se realizaron ensayos de inactivación a pH 2 a partir de cultivos crecidos y recuperados en diferentes medios en los que todas las cepas tuvieron descensos de varios ciclos logarítmicos y el comportamiento entre mutantes y cepa parental dependió del medio. Los resultados obtenidos indican que la resistencia al ácido en *Salmonella* es un proceso que depende de muchos factores en el que varios de los genes analizados podrían tener un papel relevante, especialmente en condiciones de acidez moderada.

## II. Summary

*Salmonella enterica* is a highly significant foodborne pathogen due to its ability to survive in adverse environments, including exposure to acidic conditions such as those found in food or the human gastrointestinal tract. Although the general mechanisms of acid tolerance have been described, the specific genes involved in this adaptation are not yet known in detail. The aim of this Final Degree Project was to identify and evaluate genes that may be involved in acid resistance using a bioinformatic prediction approach combined with experimental analysis.

Based on a literature review and the use of the STRING tool, a protein-protein interaction network was created that allowed the identification of candidate genes, including three non-

coding RNAs. The corresponding isogenic mutants in *Salmonella* Typhimurium 14028s were validated by PCR to confirm the correct insertion of the resistance cassettes in each gene.

Subsequently, the growth of the parental strain and the mutants was evaluated in acidified LB and TSB media. At pH 4.0, no growth was observed in any of the strains, while at pH 4.5 and 5.0, differences could be detected, with the parental strain showing the highest growth. In addition, inactivation tests were performed at pH 2 from cultures grown and recovered in different media, in which all strains showed decreases of several logarithmic cycles and the behavior between mutants and the parental strain depended on the medium.

The results obtained indicate that acid resistance in *Salmonella* is a process that depends on many factors, in which several of the genes analyzed could play a relevant role, especially under conditions of moderate acidity.

The results obtained indicate that acid resistance in *Salmonella* is a process that depends on many factors, in which several of the genes analyzed could play a relevant role, especially under conditions of moderate acidity.

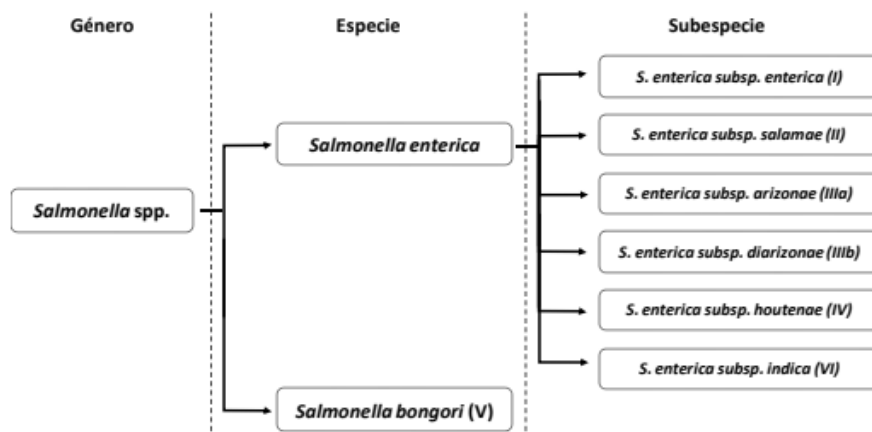
## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Características del género *Salmonella*

*Salmonella* es un género bacteriano que pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Se trata de bacilos Gram negativos, bacilares, anaerobios facultativos y no formadores de esporas, suelen ser móviles gracias a sus flagelos peritricos, aunque existen serovariedades no móviles como *S. gallinarum* y *S. pullorum* (Jajere, 2019; Parra et al., 2002). Además, tienen fimbrias que van a facilitar la adhesión e infección en una gran variedad de hospedadores, incluyendo mamíferos, aves, reptiles, anfibios e insectos (Jajere, 2019).

Desde el punto de vista bioquímico, esta especie se caracteriza por ser catalasa positiva (con algunas excepciones) y oxidasa negativa, por su capacidad de fermentar glucosa con producción de ácido y gas, la utilización del citrato como única fuente de carbono, la reducción de nitratos a nitritos y la producción de H<sub>2</sub>S (Le Minor y Popoff, 1987). El pH óptimo para su crecimiento se sitúa entre 6,6 y 8,2, y muestran una gran capacidad para soportar concentraciones altas de sal (Parra et al., 2002).

El género se divide en dos especies, *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. *S. enterica* es la más relevante en el ámbito de la salud pública y a su vez se divide en seis subespecies (enterica, salamae, arizonae, diarizonae, houtenae e indica), que engloban más de 2600 serotipos descritos. Estos serotipos se diferencian entre ellos en función de tres antígenos: el lipopolisacárido (O), el flagelar (H) y el capsular (K) (Heuzenroeder, 2000).



**Figura 1.** Clasificación de los microorganismos del género de *Salmonella* (Guillén, 2022).

En cuanto a su diversidad biológica, algunas serovariedades presentan una gran especificidad de hospedador como *S. Typhi*, causante de la fiebre tifoidea (Coburn, Grassl y Finlay, 2007). Por

otro lado, las serovariedades de *Salmonella* no tifoideas pueden causar infecciones gastrointestinales en humanos y animales de sangre caliente, siendo responsable de millones de casos de gastroenteritis cada año (EFSA, 2019).

#### 1.1.1. Importancia de *Salmonella* como patógeno alimentario

*Salmonella* es uno de los principales patógenos de transmisión alimentaria a nivel mundial y representa un importante problema de salud pública. En la Unión Europea, la salmonelosis se sitúa entre las infecciones gastrointestinales más frecuentes y constituye una de las principales causas de brotes alimentarios, con tasas cercanas a 15 casos por 100.000 habitantes en los últimos años (EFSA, 2021; EFSA y ECDC, 2024)

Los alimentos más frecuentes en los brotes incluyen huevos y ovoproductos, carne de ave, carne de cerdo y sus derivados, productos de panadería y alimentos listos para el consumo como lácteos, zumos, ensaladas y especias (EFSA, 2022; EFSA, 2023). Los serotipos *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* son los más comunes en brotes y en casos esporádicos (RNVE, 2022).

Las infecciones por el género *Salmonella* se pueden dividir en dos grandes grupos. Por un lado, las fiebres tifoideas y paratifoideas, que son producidas por serovariedades adaptadas al ser humano como *S. Typhi* y *S. Paratyphi*, las cuales causan síntomas graves y una elevada mortalidad si no hay tratamiento (Coburn, Grassl y Finlay, 2007; Crump et al., 2015). Por otra parte, las *Salmonellas* no tifoideas (NTS), como *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, son responsables de la mayoría de los casos y producen generalmente gastroenteritis autolimitada, la cual se caracteriza por dolor abdominal, diarrea, vómitos y fiebre, con baja mortalidad, pero un gran impacto sanitario y económico debido al gran número de personas afectadas (Liu, 2017; Scallan et al., 2011).

En conclusión, la elevada incidencia de salmonelosis, la gran variedad de alimentos implicados y su gran capacidad para generar enfermedades gastrointestinales, hacen de *Salmonella* uno de los patógenos alimentarios de mayor importancia a nivel mundial.

#### 1.2. El pH ácido como agente de control en la cadena alimentaria

El pH del medio es una característica de gran importancia en la supervivencia y el crecimiento de los microorganismos, ya que afecta al metabolismo y a la integridad de las estructuras celulares. Los ácidos en disolución al liberar protones ( $H^+$ ) provocan cambios en el medio (homeostasis) intracelular y pueden provocar que su supervivencia se vea comprometida, lo que

convierte al entorno ácido en una barrera importante frente a los patógenos (Madigan et al., 2021).

*Salmonella*, es capaz de crecer en un rango de pH entre 3,8 y 9,5, aunque su crecimiento óptimo se sitúa en torno a un pH de 7,5 (Podolak et al., 2010). Esta capacidad de crecimiento a un amplio rango de pH refleja la adaptabilidad del patógeno en medios ácidos moderados y capacidad de supervivencia en condiciones adversas que pueden ser letales para otros microorganismos.

A lo largo de la cadena alimentaria, se pueden identificar ambientes en los que el pH es muy variado, incluyendo ambientes en los que el pH es muy bajo y, por tanto, potencialmente letal para los microorganismos. Esto ocurre, por un lado, cuando de forma intencionada (o aprovechando su presencia de forma natural) se usan ácidos orgánicos como el cítrico en la conservación y desinfección de alimentos. Por otro lado, en la cadena alimentaria las células microbianas también se pueden enfrentar a ácidos inorgánicos, como el ácido clorhídrico del estómago que actúa como barrera frente a potenciales infecciones.

#### 1.2.1. Ácidos orgánicos: alimentos ácidos y aditivos alimentarios/desinfectantes

Los ácidos orgánicos son compuestos (ácidos débiles) ampliamente utilizados en la conservación y desinfección de alimentos debido a su eficacia antimicrobiana y a su seguridad toxicológica. Su modo de acción difiere del de los ácidos inorgánicos, ya que su grado de disociación parcial les permite actuar tanto en el exterior como en el interior de la célula. En su forma no disociada, los ácidos orgánicos pueden atravesar la membrana celular por difusión pasiva; una vez dentro, al encontrarse con un pH más elevado, se disocian liberando protones ( $H^+$ ) y aniones que acidifican el citoplasma, alteran la homeostasis celular e interfieren en rutas metabólicas esenciales (Booth y Kroll, 1989; Foster, 2000). Por el contrario, los ácidos inorgánicos, como el ácido clorhídrico, se encuentran totalmente disociados en el medio y ejercen su efecto de forma externa, principalmente mediante la desnaturalización de proteínas y la alteración de las membranas (Beales, 2004).

El grado de disociación de los ácidos orgánicos, determinado por su pKa y el pH del medio, condiciona directamente su permeabilidad y, por tanto, su eficacia antimicrobiana. Además, algunos de estos compuestos presentan propiedades complementarias a la acidificación, como la quelación de cationes metálicos (en el caso del ácido cítrico) o la inhibición de enzimas con grupos sulfhidrilo (Davidson, 1997; Roth y Keenan, 1971).

Por todo ello, y dado que constituye el objeto de estudio del presente trabajo, se profundizará específicamente en el ácido cítrico, un ácido orgánico débil con múltiples aplicaciones en la industria alimentaria, tanto como aditivo acidulante y antioxidante como por su potencial efecto antimicrobiano.

El ácido cítrico es uno de los ácidos orgánicos más usados dentro de la industria alimentaria gracias a su origen natural y a la seguridad que le aporta al consumidor. Su uso más común es como aditivo acidulante (E-330). Además, se utiliza como agente antioxidante lo que lo hace un compuesto muy versátil y de alta calidad tecnológica (Burdock, 2010). Su uso en la Unión europea está regulado por el Reglamento (CE) Nº 1333/2008 sobre aditivos alimentarios.

Este compuesto está presente (de forma natural o añadido voluntariamente) en una gran cantidad de alimentos como refrescos, zumos, mermeladas, confitería, derivados cárnicos y productos lácteos. Su papel principal en estos productos va a ser garantizar la estabilidad microbiológica y prolongar su vida útil. En el ámbito de la higiene alimentaria también se ha usado como desinfectante para superficies de trabajo y equipos de procesado en plantas de producción, debido a su capacidad microbiana en combinación con otros agentes (Ricke, 2003).

En definitiva, los ácidos orgánicos, y el cítrico en particular, desempeñan un papel de gran importancia en la conservación y seguridad alimentaria, ya que contribuye tanto al control de patógenos como a la formulación de alimentos y a la higiene de las plantas de procesado.

### **1.3. Mecanismos de resistencia de *Salmonella* frente al estrés**

La supervivencia y persistencia de *Salmonella enterica* en un gran abanico de entornos se debe a su capacidad de detectar y responder de una manera eficaz a las diferentes condiciones de estrés. A lo largo de su vida, este patógeno se enfrenta a cambios en la temperatura, pH, osmolaridad, disponibilidad de nutrientes y exposición a compuestos antimicrobianos tanto en el ambiente como en el interior del huésped (Spector y kenyon, 2012). Para superar estos desafíos, la bacteria ha desarrollado una compleja red de respuestas reguladas que le permiten mantener la homeostasis y garantizar la supervivencia celular bajo condiciones adversas.

En el medio ambiente, *Salmonella* se encuentra expuesta a fluctuaciones constantes que afectan de una manera directa a su crecimiento. Las variaciones de temperatura, el pH y la concentración de solutos, junto con la escasez de nutrientes, son los principales factores de

estrés a los que esta bacteria debe adaptarse para mantener su viabilidad (Winfield y Groisman, 2003; D'Aoust et al., 2001).

Por ello *Salmonella* ha desarrollado una gran capacidad de adaptación y una gran tolerancia a rangos altos de temperatura, pH y concentración salina. Así, se ha observado que puede crecer a pH comprendidos entre 3,9 y 9,5, soportar concentraciones de NaCl de hasta el 4% (p/v) y resistir temperaturas que oscilan entre 2 °C y 54 °C (D'Aoust et al., 2001). Estas propiedades le confieren una notable estabilidad durante el procesado, almacenamiento y manipulación de alimentos, favoreciendo su persistencia en la cadena alimentaria.

Durante su paso por el huésped, *Salmonella* también debe adaptarse a un conjunto de condiciones fisiológicas adversas. Tras la ingestión de alimentos contaminados, en el intestino, las bacterias que sobreviven al ambiente ácido se enfrentan a factores de estrés adicionales, como la presencia de sales biliares, péptidos antimicrobianos y limitación de oxígeno y nutrientes. En esta etapa, la activación de sistemas reguladores específicos permite mantener la integridad celular y continuar su ciclo vital a pesar del entorno hostil en el que se encuentran (Rychlik y Barrow, 2005; Finlay y Falkow, 1989). Estas adaptaciones además de favorecer la supervivencia de la bacteria frente a mecanismos defensivos del huésped también forman parte de la respuesta general de *Salmonella* frente a diferentes tipos de estrés ambiental.

Las diferentes respuestas frente a los diferentes tipos de estrés están controladas por una red de reguladores globales que coordinan la expresión de genes implicados en la supervivencia celular. Entre ellos destaca RpoS, un factor sigma alternativo que actúa como regulador en la respuesta general al estrés, controlando la transcripción de muchos genes implicados en la resistencia a condiciones adversas como limitación de nutrientes, estrés oxidativo o la acidez (Foster, 2000; Kenyon y Spector, 2011).

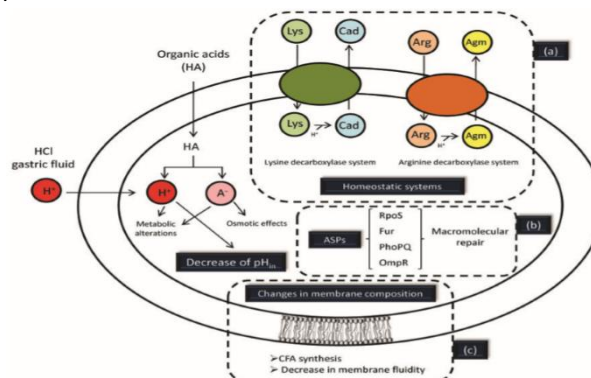
Por otro lado los sistemas de dos componentes constituyen mecanismos de regulación más específicos, que permiten a la célula detectar y responder a cambios más concretos. En general, estos sistemas están formados por una proteína sensora de membrana con actividad quinasa y un regulador de respuesta citoplasmático que modula la expresión génica (Groisman, 2001). Entre ellos el sistema PhoP/PhoQ tiene un papel fundamental en la adaptación de *Salmonella* a condiciones de bajo magnesio y en la respuesta frente a ácidos inorgánicos y otros factores de estrés, además de intervenir en la regulación de la virulencia (Altier, 2005; Kenyon y Spector, 2011). Gracias a esta red de control, *Salmonella* ajusta su metabolismo, repara daños y adapta su comportamiento a las condiciones ambientales

En conjunto, estas estrategias permiten que *Salmonella* mantenga su viabilidad tanto en ambientes naturales y con condiciones idílicas como en el interior del huésped. Su capacidad de adaptarse frente a diferentes estreses ambientales y fisiológicos constituye uno de los factores clave de su éxito como patógeno alimentario (Spector y Kenyon, 2012).

### 1.3.1. Sistemas relacionados con la tolerancia al ácido

La exposición a ambientes con pH muy bajos, como el del estómago humano, resulta letal para la mayoría de bacterias, como ya se ha descrito anteriormente. Para sobrevivir en estas condiciones *Salmonella enterica* ha desarrollado mecanismos de resistencia al ácido que le permiten superar esta barrera y alcanzar el intestino, donde puede colonizarlo (Spector y Kenyon, 2012). Así, Álvarez-Ordóñez et al. (2010) demostraron que la exposición de *Salmonella Typhimurium* a medios acidificados con HCl hasta un pH de 4,5 induce una respuesta adaptativa que mejora su tolerancia posterior a pH 3,0, semejante al jugo gástrico. Estos resultados indican que, aunque el jugo gástrico actúe como una defensa eficaz, *Salmonella* puede superar esta barrera en determinadas circunstancias. De forma similar, y al igual que ocurre con el ácido clorhídrico, la exposición a ácidos orgánicos como el cítrico también puede inducir mecanismos de resistencia en *Salmonella* (Álvarez-Ordóñez et al., 2010). Esto resalta la importancia de controlar la concentración de estos compuestos en procesos de conservación y desinfección alimentaria.

Estos mecanismos de desarrollo de resistencia se denominan de forma genérica “respuesta de tolerancia al ácido” (ATR, del inglés *acid tolerance response*). Se considera una respuesta adaptativa ya que se induce tras la exposición de la bacteria a pH subletales, confiriéndole posteriormente protección frente a condiciones más extremas (Foster y Hall, 1990). Las tres estrategias principales que *Salmonella* pone en marcha para enfrentarse a un ácido son: (a) los sistemas regulatorios de la homeostasis del pH, (b) la síntesis de proteínas de choque ácido (ASPs, acid shock proteins) y (c) las modificaciones en la composición de la membrana (Álvarez-Ordóñez et al., 2012).



**Figura 2.** Principales sistemas de los que consta la respuesta de tolerancia al ácido (ATR) en

*Salmonella*. Fuente: Álvarez-Ordóñez et al., 2011.

Los sistemas de homeostasis del pH consisten en mecanismos que son capaces de mantener el pH intracelular en un rango que sea compatible con la actividad enzimática. Entre estos destacan las bombas antiporte  $K/H^+$  y  $Na^+/H^+$ , que expulsan protones del citoplasma al exterior celular (Foster, 2000). Otros mecanismos dependen de aminoácidos, como las descarboxilasas de lisina (CadA) y arginina (AdiA), que consumen protones en la descarboxilación y exportan productos (cadaverina o agmatina) a través de antiportadores de membrana (CadB, AdiC), ayudando a elevar el pH intracelular (Álvarez-Ordóñez et al., 2010).

La síntesis de ASPs es otra parte esencial del ATR. Estas proteínas son las encargadas de prevenir y reparar los daños ocasionados en macromoléculas celulares por el estrés ácido. Su expresión varía según la fase de crecimiento: en la fase logarítmica, la regulación depende principalmente de RpoS (factor sigma S), Fur y el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ (Audia et al., 2001). RpoS se induce por exposición al pH menores de 5,5 y promueve una protección sujeta a valores más bajos. Fur, además de regular el metabolismo del hierro, controla la expresión de ASPs de forma completamente independiente de este elemento, ofreciendo así una protección transitoria frente a ácidos orgánicos (Foster, 2000; Álvarez-Ordoñez et al., 2012). Por su parte el sistema PhoP/PhoQ responde a bajas concentraciones de  $Mg^{2+}$  y activa la transcripción de genes asociados con la resistencia a ácidos inorgánicos (Foster, 2000). En fase estacionaria, la ATR incluye mecanismos dependientes de OmpR, un regulador de respuesta que tras fosforilarse por la quinasa EnvZ, desencadena la expresión de genes específicos relacionados con la adaptación a pH bajo (Bang et al., 2000).

Por último, la modificación de la composición de la membrana celular es otro aspecto de gran relevancia para la supervivencia en medios ácidos. Así, se ha observado que *Salmonella* hace una modificación en la proporción de ácidos grasos insaturados (UFA) y saturados, disminuyendo la fluidez de la membrana y aumentando la proporción de ácidos grasos cíclicos (CFA), los cuales dan una mayor estabilidad a la estructura a la membrana y una mayor resistencia al daño oxidativo (Gorgan y Cronan, 1997; Kim et al., 2005).

Estos sistemas confieren a *Salmonella enterica* una gran capacidad de adaptación frente a ambientes hostiles, lo que refuerza su persistencia en alimentos y en el interior del huésped y contribuye a su relevancia como patógeno alimentario (Spector y Kenyon, 2012).

#### 1.4. Estudios de los mecanismos de resistencia: la función de genes

El estudio de la función génica en bacterias es fundamental para comprender los mecanismos que mediante los que están regulan su metabolismo en general, y la resistencia al medio ácido en particular. Para ello se pueden emplear distintas herramientas experimentales y bioinformáticas que permiten cambios genéticos con las respuestas fenotípicas.

La mutagénesis tanto dirigida como como aleatoria constituyen una de las estrategias experimentales más usadas para inactivar genes y analizar las consecuencias de su pérdida sobre el crecimiento, la resistencia al estrés o la virulencia (Van Opijnen y Camilli, 2013). La complementación génica es un método complementario en el cual se reintroduce una copia funcional del gen mutado para confirmar su implementación en el fenotipo (Maloy y Stewart, 1993). Además, las técnicas *ómicas*, como la transcripción o la proteómica, facilitan el estudio de la expresión génica global y son capaces de identificar rutas metabólicas o mecanismos de adaptación que participan en en la supervivencia bacteriana bajo condiciones de estrés (Mortazavi et al., 2008). El uso de estas técnicas permite entender cómo los genes influyen en los procesos celulares en la capacidad de virulencia bacteriana.

Por otra parte, las herramientas bioinformáticas dan apoyo en la interpretación de datos y en la predicción funcional de genes. Bases de datos como NCBI o UniProt junto con programas de alineamiento permiten identificar genes homólogos y establecer posibles funciones. Plataformas como STRING son capaces de representar redes de interacción proteína-proteína, ayudando a comprender relaciones entre distintas rutas metabólicas (Szkłarczyk et al., 2023). En conjunto, el uso de estrategias experimentales y análisis por ordenador (in silico) constituye la base actual para el estudio funcional de genes bacterianos, combinando el análisis experimental con el uso de herramientas bioinformáticas.

##### 1.4.1. Colección de mutantes de *Salmonella* del profesor McClelland

Una herramienta muy útil para el estudio de la funcionalidad de los genes en *Salmonella enterica* es la colección de mutantes isogénicos desarrollada por el grupo del profesor McClelland en colaboración con Stefan Porwollik. Esta colección fue descrita por Porwollik et al. (2014) y constituye una base experimental muy utilizada para el análisis funcional de genes individuales en esta especie bacteriana.

Este estudio consistió en la elaboración de una biblioteca de deleciones génicas definidas en la cepa *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028s, en la cual cada cepa mutante

presenta la eliminación de un solo gen. Estas deleciones se generaron por el sistema Lambda Red recombinasa, sustituyendo cada gen por un cassette de resistencia a antibióticos (kanamicina o cloranfenicol). Después, la correcta construcción de los mutantes se verificó por análisis molecular y secuenciación, garantizando así la precisión del estudio.

Esta colección incluye aproximadamente 3.700 mutantes, cada uno con la deleción dirigida de un gen no esencial del genoma de *S. Typhimurium*. La comparación del fenotipo de estos mutantes frente a la cepa parental permite analizar la función del gen eliminado, ya que la pérdida de función puede traducirse en cambios observables, como menor supervivencia bajo estrés, disminución de virulencia o alteraciones en el crecimiento. Por ello, la colección se ha convertido en una herramienta muy útil para el estudio de procesos como la resistencia a condiciones de estrés, la supervivencia intracelular o la virulencia en modelos animales. Además, está disponible en BEI Resources, lo que facilita su utilización por otros grupos de investigación.

Es por esto que la colección desarrollada por el profesor McClelland es un recurso clave y de gran importancia para el avance del conocimiento sobre los mecanismos de adaptación y patogenicidad de *Salmonella enterica*.

#### 1.4.2. Herramientas bioinformáticas para el análisis funcional

El uso de herramientas bioinformáticas también tiene un papel crucial en la investigación de la función génica (y de otros tipos), ya que permite analizar grandes cantidades de información biológica para entender mejor la función de los genes. Estas plataformas facilitan la interpretación de datos genómicos y ayudan a establecer relaciones entre genes, proteínas y procesos celulares. Algunos ejemplos de estas herramientas se describen brevemente a continuación.

Una de las herramientas más utilizadas es STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*), una base de datos que recauda información experimental y computacional sobre interacciones proteína-proteína, dando una visión global de las posibles redes que se establecen en los organismos (Szklarczyk et al., 2023).

Cytoscape es otra herramienta útil para la visualización y análisis de redes biológicas. Puede asumir diferentes formatos de entrada lo que le confiere una gran versatilidad para el trabajo con diferentes fuentes de datos (Shannon et al., 2003).

Estas herramientas permiten el análisis de genes y proteínas, permitiendo fusionar datos experimentales con información procedente de bases de datos públicas y ayudando a entender mejor los mecanismos moleculares que participan en la fisiología bacteriana.

### **1.5. Non-coding RNA (ncRNA)**

Los RNA no codificantes (ncRNA) son moléculas que no se traducen en proteínas pero desempeñan un papel esencial en la regulación post-transcripcional de la expresión génica. En bacterias, estos RNA suelen tener una longitud de entre 50 y 300 nucleótidos y actúan principalmente uniéndose a regiones complementarias de los mRNA para modular su estabilidad o su traducción. Este tipo de regulación permite una respuesta rápida y eficaz frente a posibles cambios ambientales, ya que no requiere síntesis de nuevas proteínas reguladoras (Vogel, 2009).

En *Salmonella enterica*, se han identificado numerosos *small* RNA (sRNA) con funciones de virulencia, capacidad de formar biopelículas y tolerancia a distintos tipos de estrés (Kröger et al., 2012). Estas moléculas son reguladores globales que ajustan la expresión de los genes implicados en la adaptación a condiciones adversas como la acidez, limitación de nutrientes, estrés oxidativo o la exposición a antimicrobianos. De esta manera, los sRNA forman parte de un nivel adicional de control que complementa los sistemas reguladores clásicos, como los de los dos componentes o los factores sigma.

Un estudio realizado por Wang et al. (2020) analizó la expresión de distintos sRNA en cepas de *Salmonella enterica* expuestas a condiciones de estrés ácido, oxidativo e hiperosmótico. Los autores observaron una regulación diferencial de seis sRNA (*RybB*, *MicA*, *MicC*, *CyaR*, *DsrA* e *InvR*) que estaban implicados en la tolerancia a estos estreses. En concreto, se observó que *RybB*, *MicA* y *MicC* están relacionados con la regulación de la composición de la membrana externa ya que controlan la expresión de porinas (*OmpC*, *OmpD*), mientras que *DsrA* y *CyaR* se encargan de modular factores sigma como RpoS y  $\sigma^E$ , claves en la respuesta general al estrés. El mantenimiento de la homeostasis y la protección frente a daños estructurales y oxidativos viene facilitado por la capacidad de aumento de la expresión de estos sRNA bajo condiciones adversas.

Además, los resultados de este estudio demostraron que la magnitud de la respuesta variaba según el tipo de estrés y había mayor inducción bajo condiciones ácidas y oxidativas. Los hechos observados en este estudio indican que los sRNA no solo actúan en respuestas específicas, sino

que también proporcionan resistencia cruzada frente a distintos estreses, ayudando a la persistencia del patógeno en entornos hostiles y en el interior del huésped.

Por otro lado, Gu et al. (2021), mediante un análisis genómico basado en mutagénesis por inserción de transposones y secuenciación (Tn-seq), identificaron en *Salmonella* Derby diversos genes asociados a la resistencia al ácido, entre los cuales destacaron *CasC* y *CasE*, componentes del sistema CRISPR-Cas tipo I-E. Este sistema produce pequeños RNA guía (crRNA), que también son RNA no codificantes que permiten reconocer y dirigir la respuesta contra secuencias específicas. Su implicación en la resistencia al estrés ácido nos sugiere que los crRNA, además de su papel inmunitario, puedan participar en la regulación de genes que estén relacionados con la tolerancia al ácido.

Ambos estudios demuestran que los RNA no codificantes, tanto los sRNA reguladores como los crRNA del sistema CRISPR-Cas, tienen un papel clave en la respuesta de *Salmonella* frente a condiciones ambientales adversas como el estrés ácido. Su capacidad para modular la expresión de genes relacionados con la composición de la membrana, la respuesta al estrés y la virulencia convierte a los ncRNA en elementos de gran importancia para entender la resistencia y supervivencia de este patógeno.

En la colección de mutantes que se va a utilizar en este estudio se incluyen tres ncRNA (*DsrA*, *InvR* y *MicA*), que han sido seleccionados por su implicación en la regulación de la respuesta al estrés ácido y en la homeostasis de la membrana (Wang et al., 2020). Su análisis nos puede ayudar a evaluar la verdadera contribución de estos elementos en los mecanismos de tolerancia al estrés ácido.

## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La capacidad de *Salmonella enterica* para resistir a diferentes condiciones como la acidez del estómago o de determinados alimentos es uno de los principales factores que contribuyen a su persistencia en la cadena alimentaria y a su potencial como patógeno. Tal y como se ha descrito anteriormente, esta bacteria tiene una gran variedad de mecanismos/sistemas que le permiten mantener una homeostasis celular y sobrevivir a estas condiciones de pH bajo.

Sin embargo, a pesar del conocimiento general de estos mecanismos aún hay falta de información sobre los genes específicos que intervienen en la tolerancia al medio ácido. La identificación de estos genes es de gran importancia para entender mejor que procesos permiten a *Salmonella* adaptarse a condiciones desfavorables, así como para establecer estrategias de control más eficaces en la industria alimentaria.

Por todo ello, el objetivo general de este trabajo se centra en la identificación y caracterización de genes implicados en la resistencia de *Salmonella enterica* a condiciones ácidas, mediante el uso de herramientas bioinformáticas y ensayos *in vitro*.

Para alcanzar este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- Identificar genes relacionados con la resistencia al ácido mediante el uso de herramientas bioinformáticas (STRING, Cytoscape, DAVID)
- Evaluar el crecimiento y resistencia de cepas mutantes de *Salmonella enterica* en genes previamente seleccionados en medios de cultivo con distinto pH y compararlos con los de la cepa parental.
- Determinar el efecto del tipo de ácido (orgánico vs inorgánico) en la capacidad de crecimiento y supervivencia de dichos mutantes.
- Confirmar por PCR las deleciones de los mutantes analizados.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Microorganismos empleados

Los ensayos se realizaron utilizando la cepa de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo; CECT 4594) y con una selección de cepas de la colección de mutantes isogénicos de *S. Typhimurium* 14028s SGD (Single Gene Deletion) (Porwollick et al., 2014) suministrada por BEI Resources (Manassas, Virginia, E.E.U.U.). Dicha colección comprende aproximadamente 3700 mutantes generados mediante deleción dirigida de genes no esenciales, los cuales fueron sustituidos por un casete de resistencia a kanamicina derivado del plásmido pCLF4.

##### 3.1.1. Selección de cepas con deleciones en genes relacionados con la resistencia al medio ácido en *Salmonella*

La selección de los genes de relevancia para este estudio se realizó mediante un análisis *in silico* empleando la plataforma STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins), tomando como referencia el genoma de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. En primer lugar, se efectuó una búsqueda múltiple de proteínas introduciendo los nombres de los genes de interés o sus identificadores correspondientes. A partir de esta búsqueda, la plataforma generó una red de interacciones proteína-proteína que describía las relaciones funcionales entre los genes analizados. Posteriormente, se solicitó una expansión de la red para incluir hasta 100 interactores adicionales, con el fin de ampliar la red funcional sin comprometer su coherencia biológica.

Una vez obtenida la red ampliada, se llevó a cabo un análisis de agrupamiento (clustering) mediante el algoritmo k-means, disponible en la propia plataforma STRING. Este método permitió identificar grupos de proteínas altamente interconectadas (clusters), definidos en función del umbral de agrupamiento sugerido por la herramienta. Los clústeres más consistentes y biológicamente relevantes se analizaron de forma individual para evaluar las posibles relaciones entre sus componentes y la resistencia al estrés ácido.

De cada clúster se seleccionó un gen representativo, algunos con evidencia bibliográfica y otros que no hubiesen sido previamente descritos en la literatura como implicados en la tolerancia al medio ácido. Con este enfoque se buscó identificar nuevos candidatos potencialmente relacionados con la resistencia a condiciones de bajo pH.

Finalmente, se comprobó la disponibilidad de mutantes con la delección de los genes elegidos en la colección de *S. Typhimurium* 14028s descrita por Porwollik et al. (2014), seleccionando aquellos que posteriormente se emplearon en los ensayos experimentales.

### **3.2. Medios de cultivo**

Para llevar a cabo los experimentos se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

- Triptone Soya Agar (TSA) de Oxoid (Basingstoke; Hampshire, Reino Unido), se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante y se suplementó con extracto de levadura (EL) de Oxoid (Basingstoke; Hampshire, Reino Unido) al 0,6% en peso seco para favorecer el crecimiento de las bacterias.

- Triptone Soya Broth (TSB) también de Oxoid suplementado con EL al 0,6%, que fue el medio utilizado para la obtención de cultivos bacterianos y la obtención de curvas de crecimiento e inactivación. En determinados ensayos, este medio se acidificó hasta los valores de pH deseados mediante la adición de ácidos orgánicos (ácido cítrico para curvas de crecimiento) o inorgánicos (ácido clorhídrico), dependiendo del tipo de experimento a realizar. El pH final se verificó mediante un pH-metro de sobremesa Crison pH-Meter BASIC 20+ (NEOTEC) previamente calibrado con soluciones tampón comerciales para garantizar la precisión de las condiciones de acidez.

-Luria-Bertani (LB) Broth (Conda, Madrid, España), es un medio líquido no selectivo, ampliamente empleado en microbiología para el cultivo general de bacterias. Al igual que en TSB, este medio se acidificó mediante ácido cítrico o HCl en determinados ensayos hasta los valores de pH deseados. En este trabajo, se utilizó específicamente para la obtención de curvas de crecimiento e inactivación de las cepas de *Salmonella*.

-Agua de peptona (AP) y agua de peptona tamponada (APT) ambas de Conda (Madrid, España). El agua de peptona se utilizó para la realización de diluciones durante los recuentos en placa, mientras que el agua de peptona tamponada se empleó para la neutralización y preparación de diluciones en los ensayos de inactivación.

Los medios se prepararon y, una vez tras distribuidos en 5 frascos de vidrio, fueron esterilizados (121°C/ 20 minutos) en un autoclave Presoclave III 80 (Selecta; Abrera, Barcelona, España). Tras la esterilización, se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso. El medio sólido (TSA-EL), antes de ser utilizado, se fundió (105°C/20 min) y una vez enfriado hasta 50°C se vertió en placas de Petri en condiciones asépticas.

### **3.3. Obtención de cultivos**

Los cultivos de la cepa parental y los mutantes de *Salmonella* Typhimurium 14028s pertenecientes a la colección se realizaron en placas de 96 pocillos con fondo plano (Thermo Scientific, Roskilde, Dinamarca). En cada columna de la placa se cultivó individualmente un mutante o la cepa parental, identificándose por el número de placa y posición correspondiente.

A partir de una placa de TSA-EL previamente incubada, se tomó con la punta estéril de una micropipeta una colonia de cada cepa y se inoculó directamente en 200  $\mu$ L de medio TSB-EL, previamente depositados en los pocillos de la placa. Las placas se incubaron a 37<sup>o</sup> C durante 24 horas en una estufa estática modelo Incubing (Selecta; Abrera, España).

Los cultivos se subcultivaron (1:100) y se incubaron 24 h a 37 <sup>o</sup>C hasta alcanzar una densidad aproximada de 10<sup>9</sup> UFC/mL.

### **3.4. Confirmación de los genotipos por PCR**

La confirmación de la identidad de los mutantes seleccionados y de la cepa parental se realizó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con el objetivo de verificar la presencia o delección de los genes de interés en los mutantes seleccionados. Para la obtención del ADN templado, se tomaron colonias individuales de cada mutante y de la cepa parental a partir de placas de TSA-EL, empleando puntas estériles de una micropipeta. cada colonia se transfirió a un vial de 500  $\mu$ L con 50  $\mu$ L de agua mili-Q estéril y se homogeneizó mediante un agitador tipo vórtex IKA® Vortex Genius 3 (IKA-Werke GmbH & Co. KG; Staufen, Alemania). Esta suspensión se utilizó como molde de ADN en la PCR.

Primero, se realizó una PCR destinada a la verificación de los mutantes, las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ L por reacción, utilizando la polimerasa NZYTaQ II 2x Green Master Mix (Nzytech, Lisboa, Portugal), agua mili-Q estéril y los cebadores forward (F) y reverse (R) que se incluyen en la tabla X del anexo I específicos para cada gen.

Para cada gen se realizaron tres reacciones para los mutantes (dos réplicas por muestra y un control negativo) siguiendo la misma composición en cada vial: 30  $\mu$ L de Master Mix, 18  $\mu$ L de agua mili-Q, 3  $\mu$ L de cada cebador y 2  $\mu$ L de ADN, sustituyendo estos últimos 2  $\mu$ L por agua estéril en los controles negativos. Adicionalmente, se llevó a cabo una PCR equivalente con ADN de la cepa parental *S. Typhimurium* ATCC 14028s, empleando los mismos cebadores y las mismas proporciones, con el objetivo de comprobar si la amplificación desde los extremos de cada gen

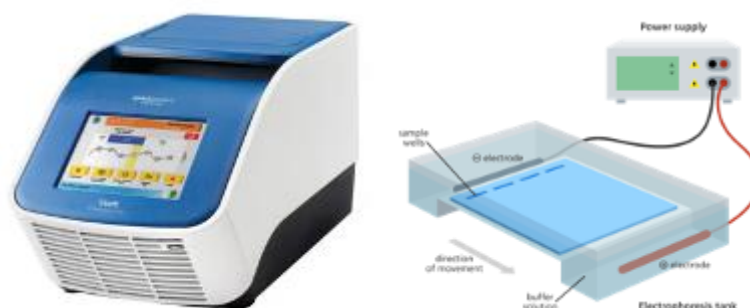
correspondía al tamaño del gen original (parental) o al del casete de kanamicina presente en los mutantes.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador programado con las condiciones de la tabla 1.

**Tabla 1.** Condiciones empleadas en la PCR.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<b>Desnaturalización inicial</b>	95°C	3 min	1
<b>Desnaturalización</b>	94°C	30 s	35
<b>Alineamiento</b>	52°C	30 s	
<b>Elongación</b>	72°C	30 s	
<b>Elongación final</b>	72°C	10 min	1

Todo este proceso se llevó a cabo en el equipo Veritri™ 96-Well Fast Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, USA).



**Figura 3.** equipos para llevar a cabo la PCR

Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, preparado con tampón TBE (1 g de agarosa en 100 mL de TBE). La mezcla se calentó hasta su completa disolución, se vertió en un molde con peine y se dejó solidificar. Una vez listo, el gel se colocó en una cubeta de electroforesis Wide Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, EE. UU.) con tampón TBE como tampón de corrida. La electroforesis se llevó a cabo aplicando una corriente constante mediante una fuente de alimentación PowerPac™ Basic (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, EE. UU.), hasta la separación visible de las bandas. Se cargó un marcador de peso molecular en el primer carril y las muestras en los carriles sucesivos (C1, C2 y C- para cada gen). Finalmente, las bandas se visualizaron bajo luz UV mediante un

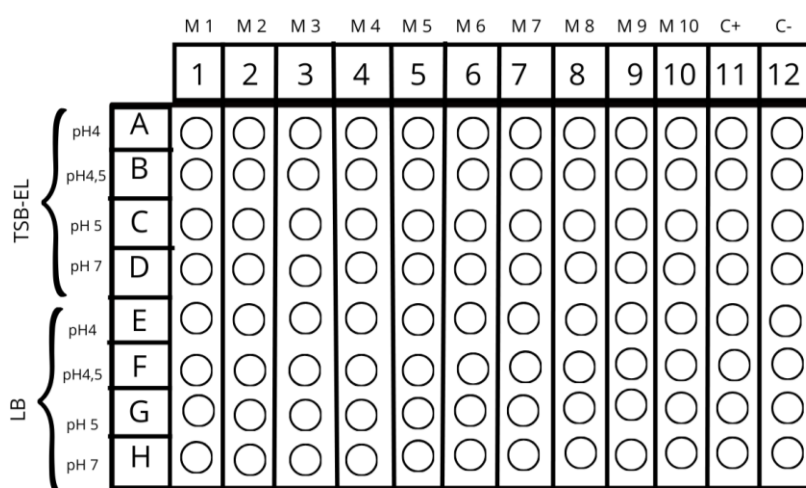
transiluminador Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, EE. UU.), comparando los tamaños obtenidos con los esperados para confirmar la presencia o delección de los genes.

### 3.5. Obtención de curvas de crecimiento

A partir de estos cultivos obtenidos según se describe en el apartado 3.3, se realizaron dos diluciones sucesivas en agua de peptona estéril: una primera dilución 1/10 y una segunda 1/5 obteniéndose finalmente una dilución final 1/50 respecto al cultivo original. Estas suspensiones se utilizaron como inóculo para las placas de ensayo.

Las determinaciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos con fondo plano (Thermo Scientific, Roskilde, Dinamarca), añadiendo 180 µL de medio y 20 µL de la dilución bacteriana correspondiente. Se utilizaron los medios de cultivo TSB-EL y LB ajustado a los valores de pH 4,0; 4,5 y 5,0 mediante la adición de ácido cítrico. En cada placa se incluyeron además un control positivo (cultivo en medio sin acidificar).

Cada placa de 96 pocillos se organizó de forma que las 4 primeras filas corresponden a los ensayos en el medio TSB-EL y las cuatro restantes en el medio LB, tal y como se muestra en la figura 4, incluyendo en ambos casos los 4 valores de pH. Se obtuvieron curvas para los diferentes mutantes (M1, M2, M3, M4...) en todos los medios como se puede ver en la figura 4. En cada placa se incluyó la cepa parental (C+) y un control negativo (C-) sin inóculo para garantizar la ausencia de contaminación y determinar la absorbancia del propio medio.



**Figura 4.** Distribución de los pocillos con los distintos valores de pH y controles en las placas de 96 pocillos utilizadas para la obtención de las curvas de crecimiento.

Las placas se incubaron a 37 °C directamente en el lector de microplacas FLUOstar Omega (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Alemania), que permitió mantener de forma continua las

condiciones de incubación durante todo el experimento. Dado que se trataba de curvas de crecimiento de larga duración, el propio equipo realizó automáticamente las mediciones de la densidad óptica a 595 nm (OD595) a intervalos regulares, sin necesidad de utilizar una incubadora externa.

Las lecturas se registraron cada 15 minutos durante un periodo total de 20 horas, obteniéndose un total de 81 mediciones (tiempos 0, 15, 30, 45mins, 1h ..., 20 h). A partir de estos datos se construyeron las curvas de crecimiento correspondientes para cada cepa, medio y condición de pH, lo que permitió comparar la cinética de crecimiento y evaluar la influencia del pH y del tipo de medio sobre la viabilidad bacteriana.

### **3.6. Ensayos de inactivación en medio ácido**

Las curvas de inactivación se realizaron para evaluar la resistencia de la cepa parental *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028s y de los mutantes seleccionados frente a condiciones ácidas. Los ensayos se llevaron a cabo realizando el cultivo y la recuperación en placa tanto en medio TSB-EL como LB.

Para cada cepa se transfirieron 800 µL del cultivo previamente obtenido a microtubos individuales de 1,5 mL, que se centrifugaron durante 3 minutos a 10.000 rpm en una centrífuga Eppendorf Centrifuge 5418 R (Eppendorf AG; Hamburgo, Alemania). A continuación, se eliminó el sobrenadante y el sedimento resultante se resuspendió en 50 µL de agua destilada estéril, homogeneizando mediante agitación con un IKA® Vortex Genius 3 (IKA-Werke GmbH & Co. KG; Staufen, Alemania). Esta suspensión celular concentrada se inoculó en el correspondiente tubo que contenían 2 mL de disolución tampón McIlvaine previamente ajustada a pH 2.0, preparada de manera independiente para cada mutante y para la cepa parental.

A partir de ese momento se tomaron muestras en intervalos regulares de 15 minutos durante un total de dos horas.

El recuento de células viables se efectuó mediante siembra en superficie en placas de TSA-EL y LB agar. Tras la incubación a 37 °C durante 24 h, se contabilizaron las colonias y se expresaron los resultados como log (UFC/mL) en función del tiempo, construyendo así las curvas de supervivencia.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Identificación de potenciales genes relevantes para la resistencia al medio ácido

A partir de una revisión bibliográfica previa en la que se identificaron genes relevantes para la resistencia al medio ácido, se utilizó la herramienta STRING para realizar una predicción de otros genes potencialmente implicados en ello. Con esta herramienta se generó una amplia red de proteínas que interactúan con los genes previamente identificados (Anexo II). En esta red se encontraban muchas proteínas relacionadas con rutas de respuesta al estrés, regulación del metabolismo o modificación de la membrana. Dentro de esta red se generaron clusters (o agrupaciones) utilizando el algoritmo *k-means* que permitieron identificar genes potencialmente implicados en la respuesta al estrés ácido. Finalmente, de estos clusters se seleccionaron diez genes candidatos para su estudio (véase en la tabla del Anexo III, escogidos por ser representativos de distintas regiones de la red y aportar diversidad funcional).

La selección no se centró únicamente en genes ya conocidos, sino que se priorizaron genes con funciones regulatorias, sensoriales o estructurales que podrían influir en la tolerancia al ácido, junto con tres RNAs no codificantes, cuya relación con la resistencia al ácido se ha descrito previamente (Wang et al., 2020) aunque no de forma robusta, por lo que el objetivo de la inclusión de estos tres ncRNAs fue corroborar mediante otra metodología su relevancia en la resistencia al medio ácido. Otro criterio de selección considerado fue la disponibilidad del mutante con esos genes en la colección de mutantes isogénicos de *S. Typhimurium* 14028s, condición imprescindible para poder validar experimentalmente su posible implicación.

En la tabla del anexo III se recogen los diez genes seleccionados para este estudio junto con su origen y sus referencias asociadas. Estos diez genes forman una base de estudio variada y coherente con los resultados de STRING permitiendo explorar rutas reguladoras y estructurales que podrían complementar los sistemas de tolerancia al ácido más conocidos por *Salmonella*.

Como puede observarse en la tabla, dentro del conjunto de los genes seleccionados se incluyó *phoQ*, cuya relación con la respuesta al entorno ácido ha sido ampliamente descrita: pertenece al sistema de dos componentes PhoP/PhoQ uno de los reguladores mejor caracterizados en la adaptación de *Salmonella* a condiciones de bajo pH. Este sistema participa en la remodelación de la membrana, la resistencia a cationes divalentes y la activación de genes implicados en la Respuesta de Tolerancia al Ácido (ATR, del inglés Acid Tolerance Respose) (Foster, 2000).

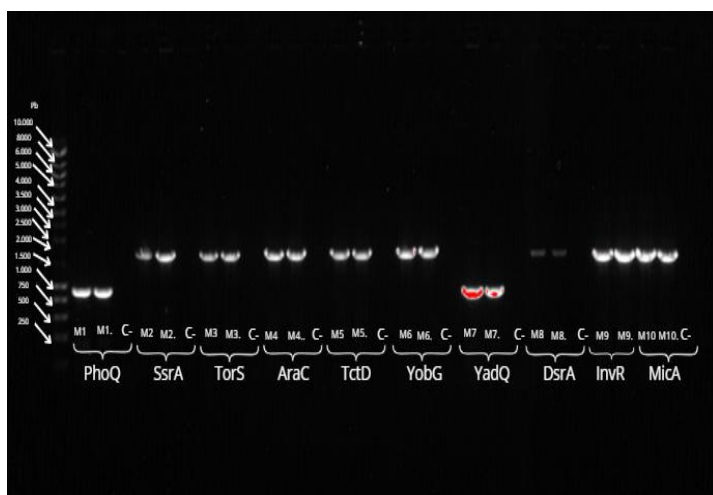
También se encuentran entre las proteínas candidatas reguladores como *AraC*, sensores como *TorS* o factores de transporte e integridad de membrana como *YadQ* o *TctD* que han sido

relacionados de una manera indirecta con procesos de adaptación a diferentes estreses ambientales. Aunque estos genes no se encuentran entre los principales de la ATR existen estudios que relacionan estas funciones de los genes con cambios en la tolerancia al pH y en la capacidad de mantener la homeostasis intracelular (Álvarez-Ordóñez et al., 2012). Por ello resulta interesante incluirlos para así poder comprobar su implicación en mecanismos secundarios que modulen la resistencia a la acidez.

Dentro de los candidatos seleccionados también se incluyeron los *RNA* no codificantes (ncRNA) *DsrA*, *MicA* e *InvR*, ya que la bibliografía reciente los identifica como reguladores relevantes en la respuesta al estrés ácido. Wang et al. (2020) demostraron que varios ncRNA modulan la adaptación a condiciones ácidas regulando factores clave como RpoS (en el caso de *DsrA*) o la composición de la membrana externa (*MicA*). Asimismo, Gu et al. (2021) mostraron que ciertos ncRNA pueden influir en la supervivencia a bajo pH en *Salmonella* a través de mecanismos de regulación postranscripcional. Por ello, y dado que estos tres mutantes estaban disponibles en la colección, se consideró interesante incluirlos como posibles candidatos implicados en la tolerancia al ácido.

En resumen, la evidencia bibliográfica junto con su presencia en los clusters respalda su selección como genes con potencial relevancia en la resistencia al medio ácido para *Salmonella enterica* y por ello fueron elegidos para este estudio.

#### 4.2. Validación de la identidad de los mutantes mediante PCR



**Figura 5.** Resultados de la PCR para la verificación de la identidad de los mutantes.

Dado que la colección de mutantes isogénicos tiene la particularidad de que se almacena en placas de 96 pocillos y cada uno de los mutantes presenta el mismo inserto con la misma resistencia a kanamicina, existe el riesgo de contaminación entre pocillos, que no permite la selección con antibióticos. Por ello, con el fin de confirmar que cada cepa con la que se trabajó

contenía la delección indicada en la documentación se realizaron PCRs específicas para cada gen.

En la figura se observa que en el primer carril el marcador de peso molecular, que es un estándar de referencia que contiene fragmentos de ADN de longitudes conocidas. A continuación, para cada gen se cargaron dos réplicas independientes del mutante correspondiente, seguidas de un control negativo (C-) sin ADN, lo que permitió confirmar la ausencia de contaminación en la reacción. Este esquema se aplicó de manera homogénea para todos los mutantes analizados. Es necesario señalar que en el caso del mutante *InvR* no se incluyó el control negativo debido a un error durante el ajuste de volúmenes en la preparación de las reacciones, aunque este incidente no afecta a la interpretación global de los resultados.

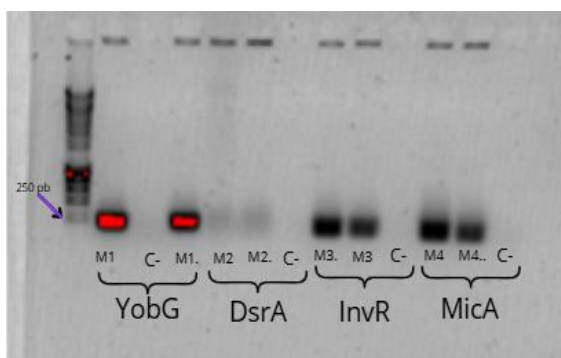
En la mayoría de los mutantes, el tamaño esperado del inserto amplificada ronda los 1550 pares de bases, ya que los cebadores se sitúan en los extremos flanqueantes del gen deleccionado y la región ampliada abarca tanto el cassette de resistencia (aprox. 800 pb) como las regiones flanqueantes necesarias para su inserción. Sin embargo, en los casos de *phoQ* y *yadQ*, el tamaño previsto es menor (aproximadamente 910 pb). Esto se debe a que, en estos dos mutantes, la combinación de cebadores empleada para la PCR no se sitúa en dos flancos externos, sino que uno de los cebadores hibrida en un extremo del inserto y el otro en una región interna del propio inserto. Como consecuencia, la distancia entre ambos puntos de anclaje es menor y el fragmento amplificado resulta más corto. En estos genes, si se hubieran utilizado cebadores situados en los flancos del gen original, el tamaño del fragmento amplificado sería muy similar al que produciría la cepa parental, lo que dificultaría distinguir entre un gen nativo y uno deleccionado. Por este motivo se recurrió a un diseño en el que la distancia entre cebadores es menor, permitiendo generar un producto diferenciado y confirmar con claridad la inserción del cassette.

Dado que el tamaño del inserto completo debe ser de 910 pares de bases para *phoQ* y *yadQ* y de 1550 para el resto de los mutantes, podemos concluir, a la vista de la imagen, que los fragmentos de ADN amplificados corresponden al ADN de los mutantes.

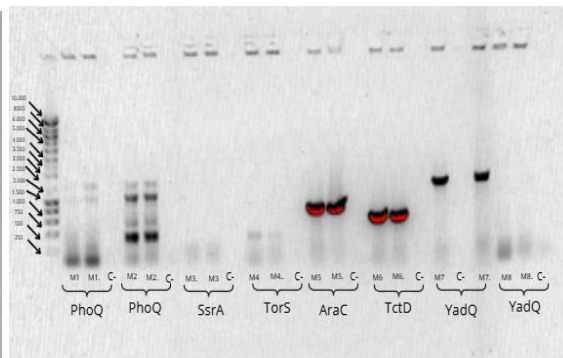
En todos los casos analizados se obtuvieron resultados de amplificación coherentes con los tamaños esperados, lo que confirma la correcta inserción del cassette de resistencia en la posición específica de cada gen.

En paralelo también se realizó también una PCR con ADN de la cepa parental *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028s utilizando los mismos cebadores empleados para los mutantes. En este caso, los fragmentos amplificados correspondieron al tamaño esperado para cada gen en

su forma nativa, lo que permitió confirmar que los cebadores eran funcionales y amplificaban correctamente la región diana en la cepa original (figura 6).



**Figura 6A.** Resultados de la PCR para la verificación de la identidad de los genes de mayor tamaño de la cepa parental. Fotografía obtenida con el equipo Gel Doc EZ Imager.



**Figura 6B.** Resultados de la PCR para la verificación de la identidad de los genes de menor tamaño de la cepa parental. Fotografía obtenida con el equipo Gel Doc EZ Imager.

### 4.3. Capacidad de crecimiento en medio ácido

Con el objetivo de determinar si las cepas con las mutaciones seleccionadas poseían una menor capacidad de crecimiento en medio ácido se obtuvieron curvas de crecimiento en diferentes medios tanto a pH ácido (4,0) como neutro (7,0): Este último a modo de control. Para ello se siguió la metodología descrita previamente (apartados 3.3 y 3.5). Estas curvas se muestran en las figuras 7A-D.

Tal y como se muestra en las figuras del anexo IV AIV A y B en condiciones de pH 7,0 todas las cepas salvo una ( $\Delta$ PhoQ) muestran un crecimiento igual o más rápido que la cepa parental. En cualquier caso, y aunque no se han cuantificado las tasas (velocidad) de crecimiento, tampoco en el caso de esta última las diferencias fueron muy grandes en comparación con la parental. En el caso del crecimiento en LB (figura 7B) se obtuvo un resultado análogo, aunque, al comparar el crecimiento en ambos medios se puede observar que la velocidad de crecimiento fue inferior en medio LB, probablemente debido a la menor disponibilidad de nutrientes de este último (particularmente los asociados al extracto de levadura). En resumen, estos resultados indican que ninguno de los mutantes tiene defectos de crecimiento generales en ausencia de estrés ácido, por lo que, de detectarse diferencias de crecimiento en medio ácido, esto sólo podría atribuirse a una menor capacidad de adaptación o respuesta al pH bajo.

Por otra parte, las figuras AIV C y D indican que (en 20 horas de ensayo) ninguna de las cepas estudiadas es capaz de crecer en TSB acidificado a pH 4,0 y el crecimiento es muy limitado (incrementos de absorbancia de menos de 0,12 unidades) en LB acidificado a pH 4,0. No obstante, en este último caso los resultados sí sugieren que algunos mutantes como *PhoQ*, *YobG* o *DsrA* tendrían una capacidad de crecimiento menor que la cepa parental.

Para tratar de determinar si realmente existían diferencias de crecimiento a pH ácido entre los mutantes y la parental de estas 10 cepas se seleccionaron 3 mutantes: *PhoQ*, ya que su implicación en la resistencia al ácido es bien conocida y *YadQ* y *YobG*, identificados mediante STRING (ver tabla del anexo III) en base a su relación con el primero.

Así, en primer lugar se obtuvieron curvas de crecimiento en medio TSB y LB ajustado a pH 4,5 y 5,0 para los mutantes y la parental y se volvió a comprar el comportamiento de la cepa parental con el de los mutantes. Estos valores se escogieron porque representan distintos grados de estrés ácido.

En las figuras del anexo V AV A-D se muestra el crecimiento de la cepa parental y de las cepas seleccionadas en medio LB y TSB a pH 4,5 y pH 5. Como se observa en las figuras la velocidad de crecimiento aumenta notablemente conforme se incrementa el pH, confirmando que estos pHs representan un entorno de estrés ácido que limita la capacidad replicativa de *Salmonella*. Este es un fenómeno todavía más marcado para el TSB, en donde las cepas de *Salmonella* presentan una velocidad de crecimiento mayor que en LB a pH neutro, igual o mayor a pH 5 e inferior a pH 4,0 y 4,5. Además, todas las cepas mutantes presentan valores de crecimiento inferiores a los de la cepa parental, lo que sugiere una menor capacidad de adaptación al estrés ácido.

Resulta destacable el comportamiento del mutante *yobG*, que en condiciones de pH neutro (figuras AIV A y B) mostraba el crecimiento más rápido, mientras que a pH 4,5 pasa a situarse entre las cepas con menor crecimiento, particularmente en medio LB. Este cambio de comportamiento indica que la delcición de *yobG* podría afectar a mecanismos específicos necesarios para mantener el crecimiento en condiciones de acidez, más allá de un posible efecto sobre la capacidad de crecimiento basal. En conjunto, estos resultados refuerzan la idea de que, en condiciones de acidez moderada, la cepa parental tiene una mayor capacidad de adaptación al estrés ácido.

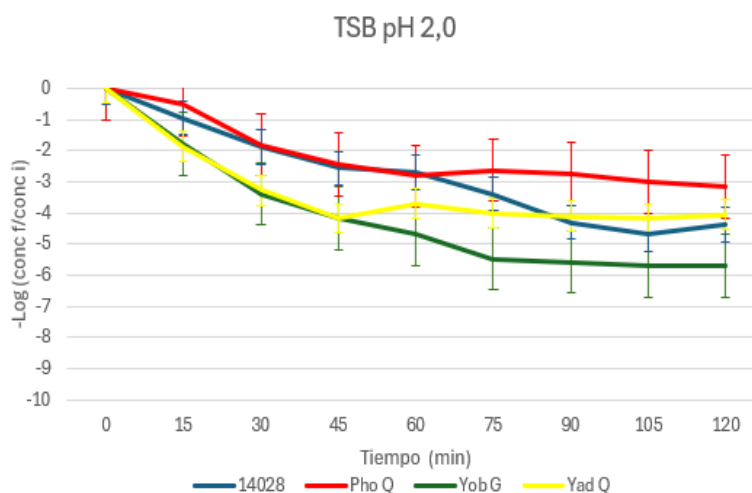
En las curvas obtenidas a pH 5 (figuras AV C y D) se observa el nivel de crecimiento más elevado de todos los ensayos realizados a pH ácido, lo cual resulta coherente al tratarse del pH más próximo a la neutralidad y, por tanto, el más cercano a condiciones favorables para el crecimiento de *Salmonella enterica*. Tal y como se aprecia dichas figuras, la cepa parental vuelve a situarse por encima de los mutantes tanto en medio TSB como en LB. Entre los mutantes analizados, *phoQ* y *yobG* muestran un crecimiento claramente inferior al de la cepa parental, mientras que *yadQ* presenta un comportamiento intermedio, aunque sin alcanzar en ningún caso los valores del control.

Estas diferencias en capacidad de crecimiento entre los mutantes y la cepa control pueden relacionarse con las funciones específicas de los genes delecionados en la adaptación al estrés y al entorno ácido. *PhoQ* forma parte del sistema regulador PhoP/PhoQ, uno de los principales mecanismos de detección y respuesta frente a señales ambientales como el pH ácido y la presencia de cationes divalentes; su deleción limita la capacidad de activar respuestas adaptativas clave, lo que se traduce en un crecimiento reducido incluso en condiciones de acidez moderada. Por su parte, *yobG*, cuya función se ha relacionado con procesos celulares esenciales relacionados con el metabolismo basal y el mantenimiento de la fisiología celular, y cuya deleción no sólo no reduce sino que hasta aumenta la velocidad de crecimiento (principalmente de la reducción de la fase lag) a pH neutro, muestra a pH 5 una pérdida marcada de capacidad de crecimiento, lo que sugiere que este gen podría estar implicado en mecanismos necesarios para sostener el crecimiento bajo condiciones de estrés ácido. En el caso de *yadQ*, asociado a funciones de membrana y transporte, su ausencia podría afectar a la homeostasis celular y a la capacidad de mantener gradientes iónicos adecuados, dando lugar a un crecimiento ligeramente inferior al de la cepa parental.

En conjunto, los resultados obtenidos a pH ácidos confirman que la cepa parental presenta una mayor capacidad de crecimiento en condiciones de acidez moderada, mientras que los mutantes, especialmente *phoQ* y *yobG*, muestran una capacidad de crecimiento en pH ácido más limitada, lo que apoya su posible implicación en mecanismos de adaptación al estrés ácido.

#### 4.4. Capacidad de supervivencia al medio ácido

Una vez confirmada la menor capacidad de crecimiento a pH ácido de estos tres mutantes, se evaluó su tolerancia al ácido mediante curvas de inactivación en TSB y LB.



**Figura 7.** Curva de inactivación en Mcllvainea pH 2 por recuento en placas de TSA-EI

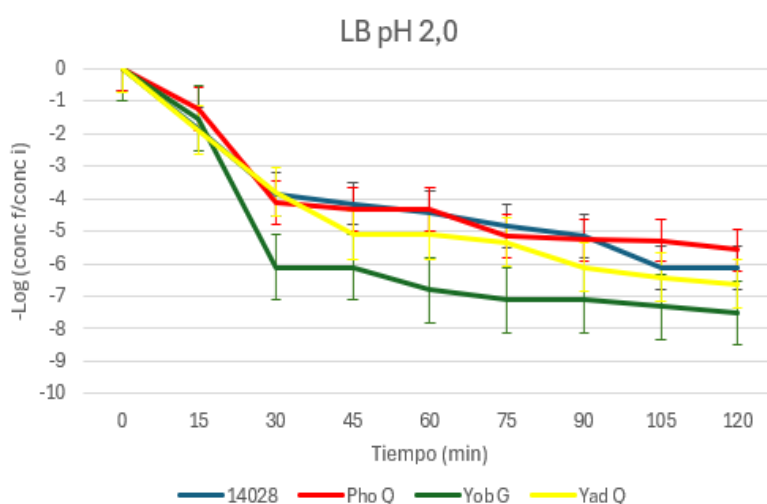
En la figura 7 se muestra la curva de inactivación obtenida en tras exponer la cepa parental y los mutantes seleccionados a medio Mcllvaine pH 2, seguido de su recuperación en medio TSB. En estas condiciones de acidez extrema, las células de todas las cepas

experimentan una pérdida marcada de viabilidad a lo largo del ensayo, alcanzándose reducciones logarítmicas elevadas al final del experimento.

Destaca que el mutante *phoQ* muestra una capacidad de supervivencia similar a la cepa parental, a pesar de haber mostrado un crecimiento claramente reducido en condiciones de acidez moderada. Este resultado sugiere que los mecanismos implicados en la capacidad de crecimiento bajo estrés ácido no coinciden necesariamente con aquellos responsables de la supervivencia frente a una inactivación severa, y que la delección de *phoQ* podría afectar de forma diferente a las rutas metabólicas asociadas al crecimiento y a las implicadas en la tolerancia a un pH extremadamente bajo.

Por el contrario, el mutante *yobG* presenta una inactivación más rápida, alcanzando reducciones logarítmicas mayores, en concordancia con su comportamiento en las curvas de crecimiento, donde ya mostraba una menor capacidad de adaptación al estrés ácido. En el caso de *yadQ*, se observa una caída inicial rápida de la viabilidad seguida de una fase de estabilización, alcanzando valores finales similares a los de la cepa parental, lo que sugiere una respuesta diferencial en las fases iniciales del estrés ácido, pero una tolerancia comparable a largo plazo.

En conjunto, estos resultados refuerzan la idea de que la resistencia al ácido en *Salmonella* es un proceso multifactorial, en el que las rutas metabólicas implicadas en el crecimiento no son necesariamente las mismas que determinan la supervivencia frente a procesos de inactivación, y cuyo efecto depende tanto del gen delecionado como del tipo de ensayo y del medio empleado.



**Figura 8.** Curva de inactivación por recuento en placa en LB acidificado a pH 2 con ácido cítrico.

Con el fin de evaluar la importancia del medio en la evaluación de las respuestas en los distintos mutantes y cepa parental se evaluó el mismo experimento pero esta vez cultivando y recuperando en medio LB.

En la figura 8 se muestra la curva de inactivación obtenida tras exponer la cepa parental y los mutantes seleccionados a medio

McIlvaine pH 2, seguida de su recuperación en medio LB. En comparación con los ensayos realizados en medio TSB, en LB se observa una inactivación más rápida, y también alcanzándose

reducciones logarítmicas mayores al final del experimento. Este resultado indica que el medio LB, más pobre desde el punto de vista nutricional, favorecería una mayor pérdida de viabilidad frente a condiciones de acidez extrema.

Entre las cepas analizadas, el mutante *yobG* es el que presenta la mayor sensibilidad al tratamiento ácido, mostrando la inactivación más rápida y alcanzando las mayores reducciones logarítmicas, lo que lo sitúa como la cepa más afectada por el estrés ácido en este medio. Por el contrario, el mutante *phoQ*, al igual que se había observado previamente en TSB, es el que presenta una menor pérdida de viabilidad, mostrando una mayor resistencia relativa frente a la inactivación ácida. En el caso de *yadQ*, su comportamiento es similar al de la cepa parental, con una caída inicial seguida de una fase de estabilización y valores finales comparables a los del control.

Las diferencias observadas entre LB y TSB, así como entre las distintas cepas, sugieren que la respuesta frente a una acidez extrema no depende únicamente del gen delecionado, sino también de las rutas metabólicas activas en cada medio. En este sentido, los mecanismos implicados en la resistencia frente a la inactivación ácida parecen diferir de aquellos asociados al crecimiento en condiciones de acidez moderada, lo que refuerza la idea de que la tolerancia al ácido en *Salmonella* es un proceso multifactorial y dependiente del contexto experimental.

Tal y como se aprecia en los resultados y como muestra la bibliografía, los mecanismos que permiten a *Salmonella* crecer en condiciones moderadamente ácidas no son los mismos que se activan cuando la bacteria se enfrenta a condiciones letales de inactivación. La tolerancia durante el crecimiento depende principalmente de sistemas reguladores como PhoP/PhoQ, remodelación de membrana y expresión controlada de sRNAs (Álvarez-Ordóñez et al., 2012; Fang et al., 2016). Sin embargo, cuando el pH desciende a valores extremos ( $\text{pH} \leq 2$ ), entran en juego rutas de resistencia completamente distintas, basadas en mecanismos de choque ácido, sistemas de reparación de daños y respuestas de emergencia que no siempre coinciden con las utilizadas durante el crecimiento (Foster, 2004; Audia et al., 2001).

Esto explicaría por qué, en las curvas de inactivación, la cepa parental se reduce más rápido que algunos mutantes, a pesar de que en las curvas de crecimiento mostraba mejor tolerancia además de que el medio podría influir también. En escenarios de estrés extremo, pequeñas diferencias genéticas pueden producir efectos opuestos respecto al crecimiento, generando patrones divergentes. En definitiva, los resultados ponen de manifiesto que la tolerancia al ácido y la resistencia a la inactivación son procesos fisiológicamente distintos, y que la respuesta de *Salmonella* depende tanto del tipo de ácido como del medio y de la vía metabólica activada en cada situación.

## 5. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este Trabajo Fin de Grado se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- El crecimiento y la supervivencia de *Salmonella* en condiciones ácidas depende de varios factores incluyendo factores genéticos (cepa) y ambientales (pH y composición del medio).
- La delección de los genes *PhoQ*, *YadQ* y *YobG* conduciría a un descenso en la capacidad de crecimiento de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 en medios con pH moderadamente ácido (pH 4-5).
- La delección de *YobG* conduciría también a un descenso en la capacidad de supervivencia de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 en medios de pH muy ácido (pH 2). Este también sería el caso de *YadQ* pero en este caso también dependería de la composición del medio de tratamiento.
- Las respuestas de los mutantes en cuanto a capacidad de crecimiento y de supervivencia al medio ácido fueron diferentes, lo que indica que la tolerancia al ácido y la resistencia a la inactivación responden a mecanismos fisiológicos distintos.

## CONCLUSIONS

From the results obtained in this Final Degree Project, the following conclusions can be drawn:

- The growth and survival of *Salmonella* in acidic conditions depends on several factors, including genetic (strain) and environmental (pH and medium composition) factors
- Deletion of the *PhoQ*, *YadQ*, and *YobG* genes would lead to a decrease in the growth capacity of *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 in moderately acidic media (pH 4-5).
- Deletion of *YobG* would also lead to a decrease in the survival capacity of *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 in very acidic media (pH 2). This would also be the case for *YadQ*, but in this case it would also depend on the composition of the treatment medium.

- The responses of the mutants in terms of growth and survival capacity in the acidic medium were different, indicating that acid tolerance and resistance to inactivation respond to different physiological mechanisms

## **6. VALORACIÓN PERSONAL**

La realización del Trabajo Fin de Grado ha supuesto una experiencia de aprendizaje y desarrollo muy enriquecedora a nivel académico y personal. A lo largo de todo el proceso he podido profundizar en temas de gran relevancia como el estudio de la resistencia al estrés ácido en *Salmonella* entérica, un tema de muy interesante en el ámbito de la microbiología y la seguridad alimentaria.

Desde el punto de vista académico este trabajo me ha permitido aplicar de manera práctica muchos de los conocimientos adquiridos durante mis estudios en el grado de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, especialmente en microbiología, biología molecular y análisis de datos experimentales. Además he tenido la oportunidad de entrar en contacto con técnicas habituales en investigación, lo cual me ha parecido un gran aprendizaje y una gran ayuda para ayudar al estudiante a decidir a que rama quiere dedicarse en un futuro.

A nivel personal, este proyecto me ha ayudado a desarrollar habilidades como la organización del trabajo, la gestión del tiempo, el análisis crítico de resultados y la redacción de textos científicos. En conjunto, considero que la realización de este Trabajo Fin de Grado ha ayudado mucho a mi formación académica y personal, preparandome y ayudando a decidir mi futuro profesional.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Álvarez-Ordóñez, A., Begley, M., Prieto, M. y Hill, C. (2012). "Salmonella spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract". *Microbial Pathogenesis*, 52(6), pp. 140–147.

Álvarez-Ordóñez, A., Fernández, A., Bernardo, A. y López, M. (2010). "Acid tolerance in Salmonella Typhimurium induced by culturing in the presence of organic acids at different growth temperatures". *Food Microbiology*, 27(1), pp. 44–49. doi:10.1016/j.fm.2009.08.002

Álvarez-Ordóñez, A., Fernández, A., López, M., Arenas, R. y Bernardo, A. (2008). "Modifications in membrane fatty acid composition of Salmonella Typhimurium in response to growth conditions and their effect on heat resistance". *International Journal of Food Microbiology*, 123(3), pp. 212–219.

Álvarez-Ordóñez, A., Prieto, M., Bernardo, A., Hill, C. y López, M. (2012). "The acid tolerance response of Salmonella spp.: An adaptive strategy to survive in stressful environments prevailing in foods and the host". *Food Research International*, 45(2), pp. 482–492.

Altier, C. (2005). "Genetic and environmental control of Salmonella invasion". *Journal of Microbiology*, 43, pp. 85–92.

Audia, J.P., Webb, C.C. y Foster, J.W. (2001). "Breaking through the acid barrier: an orchestrated acid tolerance response in enteric bacteria". *International Journal of Medical Microbiology*, 291(2), pp. 97–106.

Bang, I.S., Audia, J.P., Park, Y.K. y Foster, J.W. (2000). "OmpR regulates the stationary-phase acid tolerance response of Salmonella enterica serovar Typhimurium". *Journal of Bacteriology*, 182(8), pp. 2245–2252.

Beales, N. (2004). "Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(1), pp. 1–20.

Booth, I.R. y Kroll, R.G. (1989). "The preservation of foods by low pH". En: Gould, G.W. (ed.), *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*, pp. 119–160. Elsevier Applied Science.

Burdock, G.A. (2010). *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*. 6ª ed. CRC Press.

Coburn, B., Grassl, G.A. y Finlay, B.B. (2007). "Salmonella, the host and disease: A brief review". *Immunology and Cell Biology*, 85(2), pp. 112–118.

Crump, J.A., Sjölund-Karlsson, M., Gordon, M.A. y Parry, C.M. (2015). "Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive Salmonella infections". *Clinical Microbiology Reviews*, 28(4), pp. 901–937.

D'Aoust, J.Y., Maurer, J. y Bailey, J.S. (2001). "Salmonella species". En: Doyle, M.P., Beuchat, L.R. y Montville, T.J. (eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, pp. 141–178. ASM Press.

Davidson, P.M. (1997). "Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds". En: Doyle, M.P., Beuchat, L.R. y Montville, T.J. (eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, pp. 520–556. ASM Press.

- EFSA (2021). “The European Union One Health 2019 Zoonoses Report”. *EFSA Journal*, 19(2).
- EFSA y ECDC (2024). “The European Union One Health 2023 Zoonoses Report”. *EFSA Journal*, 22(12): e9223.
- European Commission (2012). *Commission Regulation (EU) No 231/2012 of 9 March 2012 laying down specifications for food additives*. *Official Journal of the European Union*, L83, pp. 1–295.
- European Parliament and Council (2008). *Regulation (EC) No 1333/2008 on food additives*. *Official Journal of the European Union*, L354, pp. 16–33.
- Fang, X. et al. (2016). “Integrated sRNA and mRNA Expression Profiling Reveals Mechanisms of Acid Tolerance in *Salmonella enterica*”. *Scientific Reports*, 6, 25403.
- Finlay, B.B. y Falkow, S. (1989). “Common themes in microbial pathogenicity”. *Microbiological Reviews*, 53(2), pp. 210–230.
- Foster, J.W. (2000). “Microbial responses to acid stress”. En: Storz, G. y Hengge-Aronis, R. (eds.), *Bacterial Stress Responses*, pp. 99–115. ASM Press.
- Foster, J.W. (2004). “*Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile”. *Nature Reviews Microbiology*, 2(11), pp. 898–907.
- Foster, J.W. y Hall, H.K. (1990). “Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella Typhimurium*”. *Journal of Bacteriology*, 172(2), pp. 771–778.
- Foster, J.W. y Spector, M.P. (1995). “How *Salmonella* survive against the odds”. *Annual Review of Microbiology*, 49, pp. 145–174.
- Giannella, R.A. (1996). “Acid barrier to ingested microorganisms”. *Gastroenterology Clinics of North America*, 25(2), pp. 249–262.
- Grogan, D.W. y Cronan, J.E. (1997). “Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria”. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(4), pp. 429–441.
- Groisman, E.A. (2001). “The pleiotropic two-component regulatory system PhoP–PhoQ”. *Journal of Bacteriology*, 183(6), pp. 1835–1842. doi:10.1128/JB.183.6.1835–1842.2001
- Gu, D. et al. (2021). “Genome-wide identification of genes involved in acid stress resistance of *Salmonella Derby*”. *Genes*, 12(4), 476. doi:10.3390/genes12040476
- Guillén, S. (2022). *Estudio de las relaciones entre resistencia al estrés, capacidad de crecimiento y virulencia en el género Salmonella*. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Huang, D.W., Sherman, B.T. y Lempicki, R.A. (2009). “Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources”. *Nature Protocols*, 4(1), pp. 44–57.
- Jajere, S.M. (2019). “A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance”. *Veterinary World*, 12(4), pp. 504–521.
- Kenyon, W.J. y Spector, M.P. (2011). “Environmental regulation of *Salmonella* virulence gene

- expression". En: Mastroeni, P. y Maskell, D. (eds.), *Salmonella in Domestic Animals*, pp. 151–175. CABI Publishing.
- Kim, B.H., Kim, S., Park, Y.K. y Bang, I.S. (2005). "Effect of cyclopropane fatty acids on the survival of *Salmonella Typhimurium* under acid stress". *Journal of Microbiology*, 43(5), pp. 443–448.
- Kröger, C. et al. (2012). "The transcriptional landscape and small RNAs of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(20), pp. E1277–E1286.
- Le Minor, L. y Popoff, M.Y. (1987). "Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*". *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37, pp. 465–468.
- Liu, D. (2017). "Salmonella". En: *Laboratory Models for Foodborne Infections*, pp. 391–399. CRC Press.
- Madigan, M.T., Bender, K.S., Buckley, D.H., Sattley, W.M. y Stahl, D.A. (2021). *Brock Biology of Microorganisms*. 16ª ed. Pearson Education.
- Maloy, S. y Stewart, V.J. (1993). *Genetic Analysis of Pathogenic Bacteria*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mortazavi, A. et al. (2008). "Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq". *Nature Methods*, 5(7), pp. 621–628.
- Parra, M., Durango, J. y Máttar, S. (2002). "Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*". *Revista MVZ Córdoba*, 7(2), pp. 187–200.
- Podolak, R. et al. (2010). "Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of *Salmonella* in low-moisture foods". *Journal of Food Protection*, 73(10), pp. 1919–1936.
- Porwollik, S. et al. (2014). "Defined single-gene deletion mutant library of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(14), pp. 5033–5038.
- Ricke, S.C. (2003). "Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials". *Poultry Science*, 82(4), pp. 632–639.
- Roth, L.A. y Keenan, T.W. (1971). "Chelation of metal ions by organic acids and its effect on microbial growth inhibition". *Journal of Food Science*, 36(3), pp. 318–321.
- Rychlik, I. y Barrow, P.A. (2005). "Salmonella stress management and its relevance to virulence and persistence in poultry". *Avian Pathology*, 34(3), pp. 211–222.
- Scallan, E. et al. (2011). "Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens". *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), pp. 7–15.
- Shannon, P. et al. (2003). "Cytoscape: a software environment for integrated models of

biomolecular interaction networks". *Genome Research*, 13(11), pp. 2498–2504.

Spector, M.P. y Kenyon, W.J. (2012). "Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses". *Food Research International*, 45(2), pp. 455–481.

Szklarczyk, D. et al. (2023). "STRING v12: Protein–protein association networks for large-scale functional discovery in genome-wide experimental datasets". *Nucleic Acids Research*, 51(D1), pp. D638–D648.

Van Opijnen, T. y Camilli, A. (2013). "Transposon insertion sequencing: a new tool for systems-level analysis of microorganisms". *Nature Reviews Microbiology*, 11(7), pp. 435–442.

Vogel, J. (2009). "A rough guide to the non-coding RNA world of *Salmonella*". *Molecular Microbiology*, 71(1), pp. 1–11.

Wang, H. et al. (2020). "Resistance profiles of *Salmonella* isolates exposed to stresses and the expression of small non-coding RNAs". *Frontiers in Microbiology*, 11, 130.

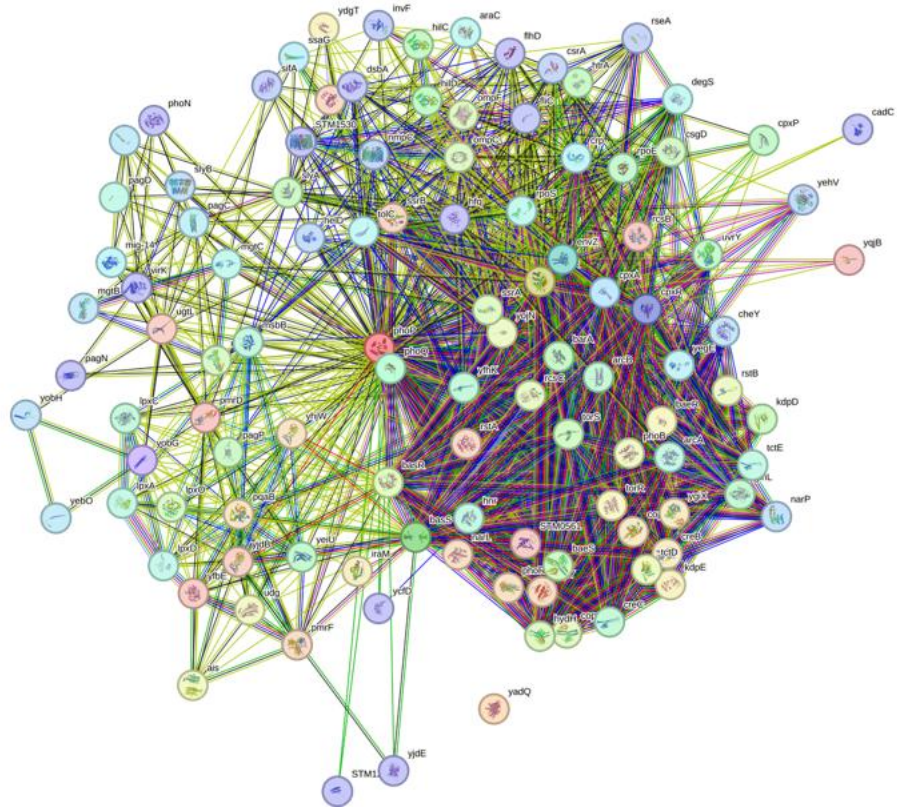
Winfield, M.D. y Groisman, E.A. (2003). "Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*". *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), pp. 3687–3694.

ANEXO I

Cebador	Secuencia (5' → 3')
phoQ F	GGAAGTTATCGTTCAGCGTATC
res_kan_aph R	CGCTTCAAAAGCGCACGTCTG
ssrA F	CGTTGGCTGTGCTGGTTAAT
ssrA R	AGGCCAGCGTATTGTTCTGA
torS F	GCGCCATAAAGTGGAGTTTG
torS R	GCGCCATAAAGTGGAGTTTG
araC F	GCGGAATATTTTCTGCCGTT
araC R	GCGTTTACGGCGCTGAATAA
tctD F	TTGCCGACGCTGTTCAAGTAA
tctD R	GCGCAGTTTCTTCTGCTTTG
yobG F	GTACCGTTCACCTGCTGATG
yobG R	GTTGGTTTCGGTTGTTTGGA
yadQ F	GGATCCTCTGGTGTTTGCTT
res_kan_aph R	CGCTTCAAAAGCGCACGTCTG
DsrA F	GTGCTCTGGATACCGTGAAA
DsrA R	GCGAACTTCTTGCGTTTGTT
InvR F	CGAGGAGGCGAAAGTGAATA
InvR R	CTGTTGTTGCCGTTGTTGTT
MicA F	GCGTTGATGTTGTTGTTGTT
MicA R	GCGAATTCCTGCCGATTAT

**Tabla A1.** Cebadores utilizados para la validación de los mutantes mediante PCR.

## ANEXO II



**Figura A2.** Red de interacción proteína–proteína generada mediante STRING a partir de genes previamente asociados a la respuesta al estrés ácido en *Salmonella enterica*.

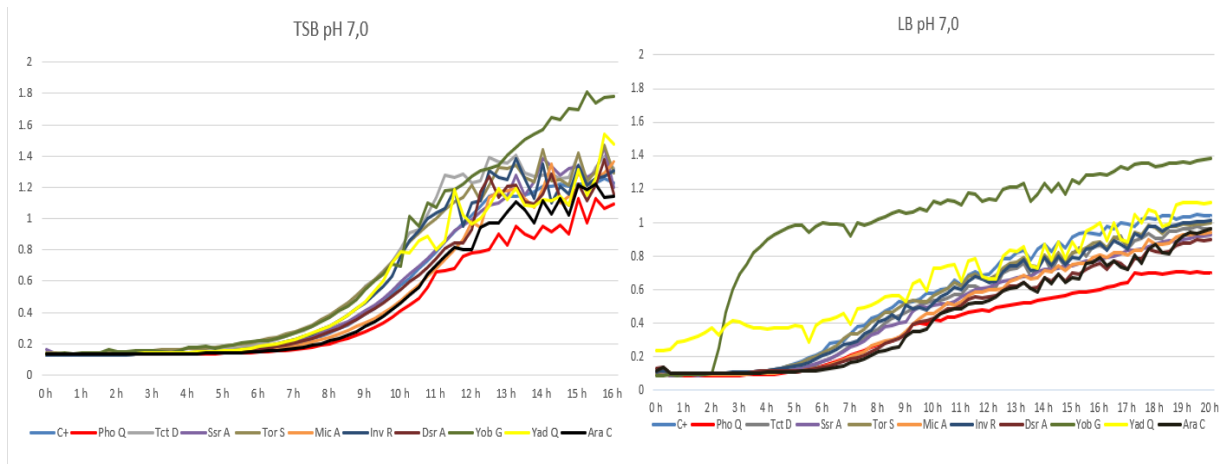
### ANEXO III

Gen seleccionado	Procedencia (STRING / bibliografía)	Gen previamente identificado	Referencia bibliográfica
PhoQ	Bibliografía + STRING	phoQ	Foster, 2000
ssrA	Interacción en STRING	phoP, basS, basR	Foster, 2000
torS	Interacción en STRING	phoP, basS, basR	Foster, 2000
araC	Interacción en STRING	ompR, envZ, phoQ	Bang et al. 2000
tctD	Interacción en STRING	phoP, ompR, envZ, cpxA, cpxR	Foster (2000); Álvarez-Ordóñez et al. (2012)
yobG	Interacción en STRING	cpxA, cpxR, phoQ	Álvarez-Ordóñez et al. (2012)
yadQ	Interacción en STRING	phoQ	Álvarez-Ordóñez et al. (2012)
DsrA (ncRNA)	Bibliografía (no aparece en STRING)	-	Wang et al. (2020)
MicA (ncRNA)	Bibliografía (no aparece en STRING)	-	Wang et al. (2020)
InvR (ncRNA)	Bibliografía (no aparece en STRING)	-	Gu et al. (2021)

ncRNA

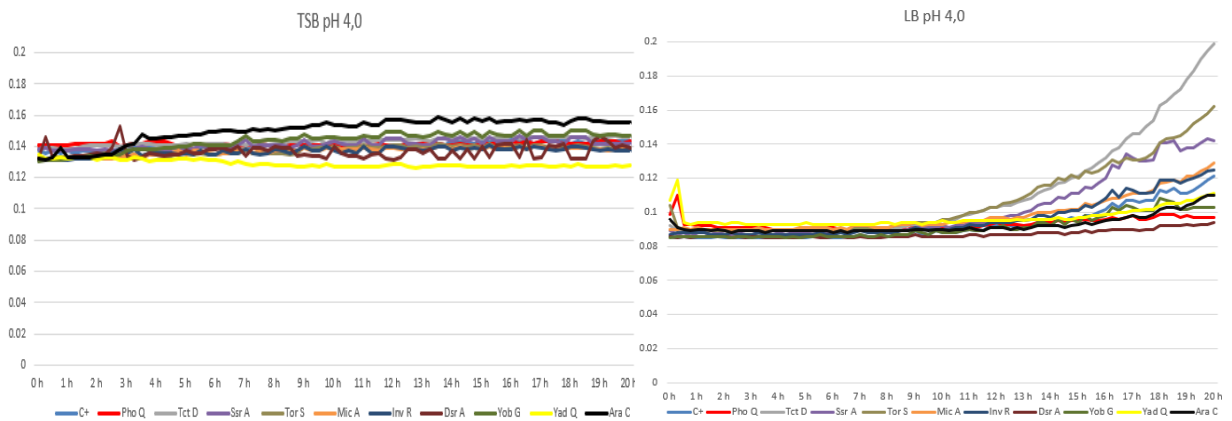
**Tabla A3.** Genes seleccionados para el estudio, su origen (STRING o bibliografía) y las referencias asociadas.

## ANEXO IV



**Figura AIV A.** Curva de crecimiento en TSB-EL (pH 7,0) de los diez mutantes seleccionados.

**Figura AIV B.** Curva de crecimiento en LB (pH 7,0) de los diez mutantes seleccionados.

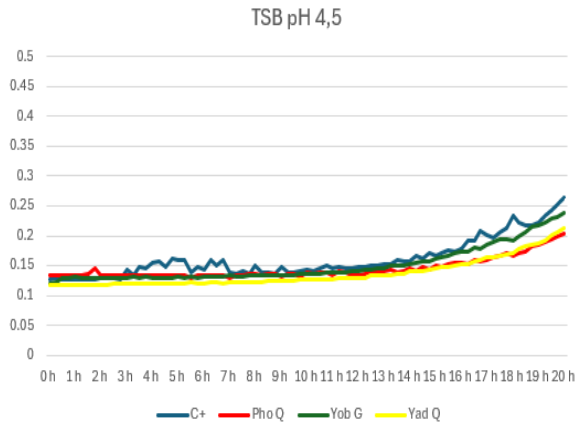


**Figura AIV C.** Curva de crecimiento en TSB-EL (pH 4,0) de los diez mutantes seleccionados.

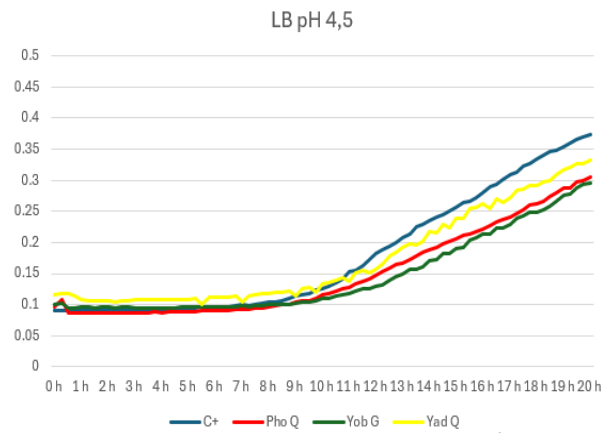
**Figura AIV D.** Curva de crecimiento en TSB-EL (pH 4,0) de los diez mutantes seleccionados.

**Figura AIV A-D.** Los valores representados corresponden al promedio de dos réplicas. No se incluyen las desviaciones estándar para facilitar la interpretación de las mismas.

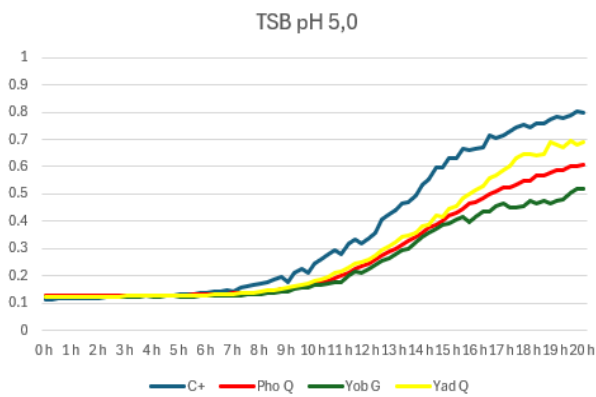
## ANEXO V



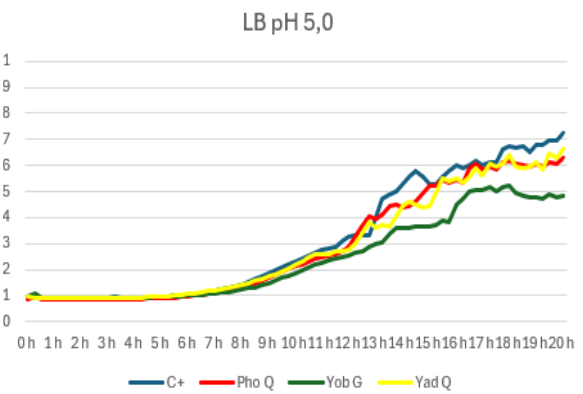
**Figura AV A** Curva de crecimiento en TSB-EL (pH 4,5) de los tres mutantes seleccionados.



**Figura AV B** Curva de crecimiento en LB (pH 4,5) de los tres mutantes seleccionados.



**Figura AV C** Curva de crecimiento en TSB-EL (pH 5,0) de los cinco mutantes seleccionados.



**Figura AV D** Curva de crecimiento en LB (pH 5,0) de los cinco mutantes seleccionados.

**Figura AV A-D.** Los valores representados corresponden al promedio de dos réplicas. No se incluyen las desviaciones estándar para facilitar la interpretación de las mismas.