

Revista Latinoamericana de Microbiología

Volumen
Volume 47

Número
Number 3-4

Julio-Diciembre
July-December 2005

Artículo:

La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*

Derechos reservados, Copyright © 2005:
Asociación Mexicana de Microbiología, AC

Otras secciones de
este sitio:

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

*Others sections in
this web site:*

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)



medigraphic.com

La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*

Jesús Ramírez Santos,* Gabriel Contreras Ferrat,** M. Carmen Gómez Eichelmann*

Vol. 47, No. 3-4
July - September, 2005
October - December, 2005
pp. 92 - 101

RESUMEN. Las bacterias que no esporulan, como *Escherichia coli*, entran a una fase de crecimiento nulo, o fase estacionaria, al agotarse los nutrientes en el medio. En esta fase disminuye el volumen celular y la forma se redondea, se engrosa la pared, disminuye el número de flagelos y se incrementa la resistencia celular a condiciones adversas. El metabolismo se reorganiza, se acumulan compuestos de reserva y osmoprotección y aumenta la degradación de macromoléculas. El DNA en el nucleóide se compacta y disminuye su metabolismo. La expresión de los genes necesarios para el crecimiento disminuye y aumenta la de aquellos relacionados con la viabilidad celular durante el ayuno. La regulación de los genes de la fase estacionaria depende principalmente del factor transcripcional σ^S (RpoS). Las células en fase estacionaria muestran además una gran heterogeneidad en propiedades como viabilidad, genotipo y mutabilidad. La aparición de subpoblaciones de mutantes capaces de utilizar nutrientes escasos sugiere la existencia de estrategias para la supervivencia durante ayunos prolongados. En esta revisión se presentan las principales características de las células de *Escherichia coli* en la fase estacionaria, así como del sistema global de regulación genética que determina la mayor parte de estas características.

Palabras clave: *Escherichia coli*, fase estacionaria, RpoS (σ^S).

INTRODUCCIÓN

Las bacterias enfrentan constantemente condiciones que limitan o impiden su crecimiento. Su habilidad para colonizar un ambiente requiere la capacidad para alternar periodos de rápida división celular y de crecimiento nulo. Las características de las células en estos periodos pueden analizarse en el laboratorio en condiciones controladas de temperatura, oxigenación y composición del medio de cultivo. La curva normal de crecimiento bacteriano presenta 4 fases: 1) fase de transición A o "lag", 2) fase logarítmica o exponencial (FE), 3) fase de transición B y 4) fase estacionaria (FS). La fase "lag" representa el tiempo necesario para reiniciar el ciclo celular después de un periodo de ayuno nutricional. Un cultivo bacteriano gene-

ABSTRACT. When nutrients become scarce *E. coli* cells enter into a non-growth phase known as stationary and develop a multiple-stress resistance state analogue to sporulation in *B. subtilis*. Morphological changes are observed, including rounded shape, loss of flagella and thickening of the cell wall. General metabolism is re-directed, macromolecular degradation is increased, and storage and osmoprotection compounds are synthesized. The reorganization of the nucleoid is accompanied by an overall repression of gene expression, but a subset of genes required for starvation survival become transcribed in a manner dependent on the stationary phase-specific subunit of RNA polymerase (RpoS or σ^S). The regulatory function of σ^S seems to be central to a global gene network that is beginning to be understood. Also, stationary phase populations are highly heterogeneous in properties as viability, genotype, and mutability. The emergence of mutant subpopulations capable of using nutrient traces suggest survival strategies during long term starvation. This review focuses on the major characteristics of *E. coli* during stationary phase and on the regulatory gene network responsible of such characteristics.

Key words: *Escherichia coli*, stationary phase, RpoS (σ^S).

ralmente se inicia al inocular el medio de cultivo con un número pequeño de bacterias en FS. En los primeros minutos posteriores al inicio del cultivo, se recupera el nivel normal de tensión helicoidal del DNA⁴⁹ e incrementa la expresión de los genes importantes para el crecimiento. Posteriormente, entre los 30 y 40 minutos, se reinicia la replicación del cromosoma y a los 80-120 minutos se presenta la primera división de la mayoría de las células.^{17,40} La FE, o de crecimiento balanceado, representa el periodo en el que hay suficientes nutrientes; las bacterias recuperan el ciclo celular e incrementan su número exponencialmente. La fase de transición B, o de crecimiento no balanceado, se inicia cuando disminuyen los nutrientes. En esta transición cambia la pendiente de la curva de crecimiento exponencial y disminuye la velocidad de síntesis de macromoléculas. La disminución de la síntesis de DNA y proteínas no es sincrónica, lo que ocasiona un incremento en la relación DNA/proteína. Por otra parte, la división celular continúa a una velocidad similar a la de la FE, lo que genera células de menor tamaño.⁴⁴ Finalmente, cuando los nutrientes se agotan, las células entran a la FS. El inicio de esta fase se define operacionalmente como el momento en el que el número de células en el cultivo no varía (Fig. 1). En estos cultivos, la FE repre-

* Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

** Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

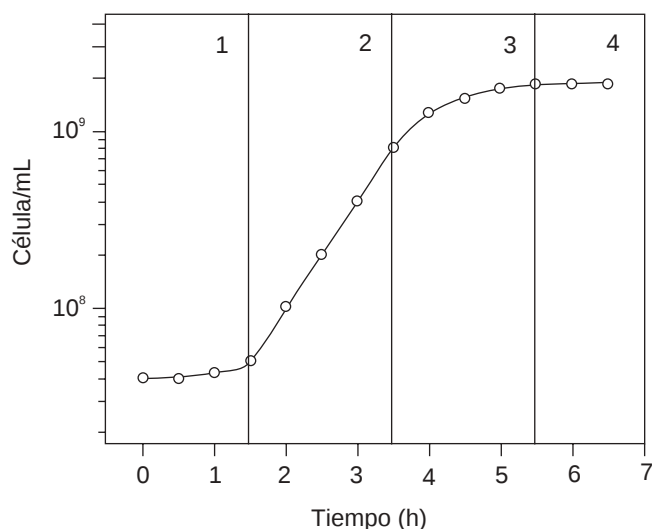


Figura 1. Curva de crecimiento en medio rico de la bacteria *Escherichia coli*. La curva de crecimiento se inicia al diluir el cultivo de una noche en medio nuevo. 1) Fase de transición A o fase "lag"; 2) Fase logarítmica o exponencial; 3) Fase de transición B; 4) Fase estacionaria. En estos cultivos la fase exponencial representa el periodo de crecimiento rápido o balanceado y la fase estacionaria el periodo de crecimiento nulo.

senta el periodo de rápida división celular o de crecimiento balanceado, mientras que la FS representa el periodo de crecimiento nulo.

Las bacterias que no esporulan en respuesta al ayuno nutricional, como es el caso de *Escherichia coli*, presentan cambios morfológicos y fisiológicos importantes al ingresar a la FS. Estos cambios no representan un estadio final con suspensión total del metabolismo, como en la esporulación, sino un estadio dinámico en el que se mantiene un metabolismo basal aun después de semanas en ayuno. Esta condición se logra mediante la expresión oportuna de genes que se organizan en redes de regulación.^{21,24,55} La respuesta genética al estrés nutricional varía en relación al tiempo que tienen las células en FS, la oxigenación, el pH, la temperatura y el primer nutrimento que se agota (fuente de carbono, nitrógeno o fosfato), entre otros factores. El conocimiento actual sobre la FS se basa principalmente en los estudios de cultivos de *Escherichia coli* en medio mínimo con glucosa o en medio rico Luria-Bertani (LB).⁴¹ Esta bacteria representa uno de los modelos biológicos más estudiados desde el punto de vista genético, bioquímico y funcional.

En esta revisión se presentan las principales características de las células de *Escherichia coli* en FS, así como del sistema global de regulación genética que se activa por la disminución de nutrimentos y que determina la mayor parte de estas características.

LA FASE ESTACIONARIA EN *ESCHERICHIA COLI*

I. Características generales de las células

En la FS ocurren cambios dramáticos en la estructura y fisiología de *E. coli*. En esta fase disminuye el volumen celular y las bacterias se redondean, disminuye la tasa global de síntesis de DNA, RNA y proteínas, aumenta la degradación de proteínas, se reorganiza el metabolismo general y se acumulan compuestos de reserva (polifosfato y glucógeno) y osmoprotección (trehalosa y glicina betaina).^{2,23,27,34,37,44} La disminución del volumen celular presenta dos etapas: La primera en la fase de transición B, como ya se mencionó, y la segunda en la FS en respuesta principalmente a la degradación de proteínas, pared celular y membrana citoplasmática.⁴⁴ El volumen del espacio periplasmático aumenta en relación al citoplasmático, las envolturas celulares sufren una recomposición y las bacterias tienden a agregarse. En la membrana citoplasmática cambia la composición de ácidos grasos y la relación de fosfolípidos. En general disminuyen los ácidos grasos mono-insaturados y aumentan los derivados ciclopilícos y los poli-insaturados; los fosfolípidos fosfatidilglicerol y fosfatidilserina disminuyen y aumenta la cardiolipina.²⁷ En la pared aumenta el grosor del peptidoglicano, mientras que en la membrana externa aumenta la cantidad de lipopolisacáridos y de la lipoproteína NlpD.²⁷ El gen para esta lipoproteína forma un operón con *rpoS*, que codifica para el factor transcripcional σ^s que, como se verá más adelante, es esencial para la regulación de la mayoría de los genes de FS. En la cara periplasmática de la membrana externa aumentan las lipoproteínas que se unen covalentemente a la pared celular, lo que incrementa las conexiones entre pared y membrana externa.^{21,27} La motilidad también cambia, el número de flagelos por célula aumenta durante la FE, alcanza su máximo en la FS temprana y disminuye rápidamente después de 6-12 h en esta fase.³⁷ Finalmente se observa que en la FS disminuye la expresión de la mayoría de los genes necesarios para el crecimiento exponencial y aumenta la de genes relacionados con funciones que aseguran la viabilidad celular durante la inanición.^{29,35,47,52,55}

Los cambios en el metabolismo general, el aumento de compuestos de reserva y de osmoprotección, la remodelación de la envoltura celular y la expresión diferencial de genes contribuyen a que las células en FS mantengan la viabilidad y muestren mayor resistencia a diversos factores de estrés, e.g., radiación ultravioleta, peróxido de hidrógeno, calor, antibióticos y concentraciones salinas elevadas. Esto sugiere que las bacterias que no esporulan en respuesta al ayuno presentan una diferenciación celular con algunas características similares a la esporulación.

II. Características generales de las poblaciones celulares

Las bacterias en FS muestran una gran heterogeneidad en propiedades como densidad celular, integridad membranal, viabilidad, genotipo y mutabilidad. La separación de las células en gradientes de Percoll mostró la presencia de 10 subpoblaciones celulares, en contraste con las 5 presentes en cultivos en FE.³⁸ Esta mayor heterogeneidad posiblemente obedece a la presencia de subpoblaciones con diferente concentración de moléculas de reserva, poliaminas, agua libre y osmoprotectores. Otro factor que puede influir en la heterogeneidad es la presencia de células con un número diferente de cromosomas. En medio LB el número de cromosomas/célula varía entre 1 y 8, mientras que en medio mínimo glucosa entre 1 y 2.² El análisis de la relación entre densidad celular y expresión de marcadores moleculares sugiere que el patrón de expresión genética en las subpoblaciones celulares es diferente.³⁸

La heterogeneidad en cuanto a viabilidad se ha estudiado mediante el uso combinado de "pinzas" de luz láser ("optical tweezers") para inmovilizar y organizar células en un medio líquido, microscopia de fluorescencia, observación directa de células individuales y obtención de cuentas viables. Los cultivos en medio rico con aproximadamente 50 h en FS tienen 65% de células viables, 30% de células muertas que perdieron la integridad membranal y 5% de células incapaces de reanudar el crecimiento, lo que muestra que la capacidad reproductiva y metabólica se modifica antes del colapso de la membrana.¹³ En cultivos anaeróbicos con menos de 10 días en FS no se detectan células muertas, lo que sugiere que la muerte celular se debe al daño por oxidación de proteínas, DNA y fosfolípidos.⁴⁴ En estudios más recientes se determinó la viabilidad de células de cultivos de FS en LB separadas en gradientes de densidad de radioselectano. Los resultados muestran que después de 10 h de FS existen dos subpoblaciones de células cultivables con un nivel similar de daño por oxidación a proteínas y de defensa contra radicales libres. Sin embargo, estas subpoblaciones difieren en su sensibilidad al ayuno de nutrientes y de fosfatos, al estrés calórico y a la exposición a peróxido de hidrógeno.¹⁰ En los cultivos de FS de 48 h se obtienen también dos subpoblaciones, una de células cultivables y otra de no cultivables. La segunda, que se genera a partir de la subpoblación de 10 h más sensible al estrés, muestra una mayor oxidación de proteínas.¹¹ Estos resultados sugieren que la pérdida de viabilidad por la oxidación progresiva de moléculas celulares está precedida por un periodo de aumento en la sensibilidad celular a otras condiciones de estrés.

La viabilidad celular en los cultivos en FS prolongada presenta tres etapas: la inicial, en la que no hay muerte celular, la intermedia, en la que muere un porcentaje elevado

de células, y la final, que puede extenderse por uno o más años, en la que se observa una disminución paulatina en el número de células viables en el cultivo. Un cultivo continuo con una cuenta viable en la FS temprana de 10^9 bacterias/ml tiene una cuenta viable aproximada de 10^5 bacterias/ml después de un año.¹⁵ En el caso de los cultivos de FS de *E. coli* en medio LB, la cuenta viable y el genotipo de las células se mantiene estable por 2 a 3 días. Posteriormente se presenta muerte celular y el crecimiento lento de una subpoblación de células mutantes que predomina en el cultivo a partir del día 10. Estas mutantes denominadas GASP (Growth Advantage in Stationary Phase) muestran una mayor capacidad para sobrevivir el ayuno.^{15,60} El genotipo y el tiempo de aparición de las primeras mutantes GASP dependen principalmente de las condiciones de crecimiento, de la composición del medio y del pH que alcanza el cultivo en la FS. Por ejemplo, en cultivos en medio LB incubados a 37°C con agitación, en los que el pH se alcaliniza al llegar el cultivo a la FS, las primeras mutaciones GASP frecuentemente se localizan en el gen *rpoS*. La mayoría de estas mutaciones disminuyen la eficiencia de σ^s para mediar la transcripción de los genes de FS, lo que favorece un incremento moderado en la expresión de los genes dependientes de σ^{70} .¹⁴ Este incremento confiere a las células en ayuno una mayor capacidad para transportar y catabolizar los aminoácidos liberados por las células muertas. Las primeras mutantes GASP son diferentes en los medios de cultivo que se acidifican en la FS, ya que σ^s es importante para responder al estrés ácido.^{24,55} Después de la aparición de las primeras mutantes GASP se repiten ciclos de muerte celular y selección de nuevas mutantes que desplazan a las anteriores. Después de aproximadamente 120-150 días en FS no se detectan más mutantes GASP.¹⁵ Esto posiblemente se debe a que en el medio de cultivo se han agotado las opciones nutritivas, lo que imposibilita la selección de nuevas mutantes.

Para explicar la muerte celular en los cultivos en FS se han propuesto los modelos de muerte celular aleatoria y de muerte celular programada. A la fecha, ninguno de los dos modelos se ha confirmado claramente. Se ha propuesto que la muerte celular programada se debe a la activación de los sistemas antitoxina-toxina presentes en el cromosoma de *E. coli*.^{5,12} En general estos sistemas consisten en un operón con dos genes, el primero codifica para una antitoxina y el segundo para la toxina correspondiente. La antitoxina se degrada más rápido que la toxina, de manera que se requiere de la transcripción continua del operón para mantener a la toxina inactiva. El efecto de la toxina puede presentarse en condiciones en las cuales se rompe el equilibrio antitoxina/toxina y la toxina puede actuar sobre su blanco.^{18,22}

Los primeros sistemas antitoxina-toxina, llamados también sistemas de adicción, se describieron en plásmidos

grandes unicopia de *E. coli*. Estos sistemas incrementan la estabilidad de los plásmidos en una población bacteriana porque inducen la muerte de la mayoría de las bacterias que no heredan al plásmido durante la división celular. En estos casos, la degradación de la antitoxina permite la acción de la toxina y la muerte celular.²² A la fecha se conoce el blanco de únicamente algunas de las toxinas de estos sistemas. Las toxinas CcdB y ParE tienen como blanco a la topoisomerasa II o girasa, Pem a DnaB, y RelE a moléculas de mRNA. Las toxinas CcdB, ParE y Pem inhiben a proteínas involucradas en la síntesis de DNA, mientras que RelE afecta la traducción.^{22,46} Posteriormente se descubrió que los cromosomas de todas las arqueas estudiadas y la mayoría de las bacterias, con excepción de las que establecen una mayor dependencia con su hospedero, tienen un número importante de sistemas antitoxina-toxina. Estos sistemas se agrupan en 7 familias: *relBE*, *parDE*, *ccdAB*, *higBA*, *vapBC*, *mazEF* y *phd/doc*. Como se ve, al menos tres tienen similitud con los sistemas presentes en plásmidos.⁴⁶ El efecto tóxico mejor conocido es el de los sistemas *relBE* y *mazEF*, que se inducen por estrés nutricional. Las toxinas RelE y MazF son RNAsas que cortan, posiblemente de manera selectiva, moléculas de mRNA.^{5,46} El grupo de Gerdes propone que estos sistemas, más que causar la muerte celular, contribuyen a disminuir la síntesis global de proteínas durante el estrés nutricional y a inducir un estado de bacterioestasis reversible.^{18,46} En el caso de MazF, experimentalmente pueden separarse los eventos bactericida y bacterioestático.⁵ El panorama actual sugiere que en la FS los sistemas antitoxina-toxina pueden ocasionar la muerte de una subpoblación celular y establecer un estado bacterioestático en otras. La ausencia de estos sistemas en bacterias intracelulares o con mayor dependencia hacia su hospedero, las cuales no enfrentan condiciones frecuentes de estrés nutricional, apunta a su posible importancia en condiciones adversas.

Finalmente, se propone la presencia de una subpoblación hipermutable en los cultivos en FS, la cual se hace evidente bajo una presión selectiva no letal. El modelo más empleado para estudiar estas mutaciones es la reversión de Lac⁻ a Lac⁺ de células en FS en medio mínimo con glucosa o glicerol cuando se exponen a lactosa como única fuente de carbono.⁹ Estas mutaciones, denominadas mutaciones "adaptativas", Cairnsianas, o de fase estacionaria, se presentan en células Lac⁻ que mantienen una actividad residual de las enzimas que catabolizan a la lactosa. En *E. coli* la generación de estas mutaciones requiere la presencia de cortes de doble hebra en el DNA vecino a los genes *lac*, una región homóloga a estos genes para la reparación por recombinación de los cortes, una DNA polimerasa con alta tasa de error (Pol IV) y un metabolismo basal que permita la síntesis limitada de DNA.^{16,51} Las mutaciones Cairnsia-

nas se generan en condiciones muy especiales, por lo que no es posible extrapolar estos resultados a lo que sucede en un cultivo de FS en LB o medio mínimo-glucosa. Actualmente existe una polémica sobre la propuesta de que la FS es mutagénica, ya que hay reportes contradictorios sobre la hipermutabilidad de las bacterias en esta fase.^{26,36,44}

La generación de subpoblaciones celulares diferentes en los cultivos en FS posiblemente representa una estrategia adicional para asegurar la posibilidad de que una fracción de células pueda reiniciar el ciclo celular en respuesta a la presencia de nutrientes en el medio.

III. El nucleóide y el metabolismo del DNA

El metabolismo del DNA y la composición de proteínas del nucleóide, una estructura muy dinámica donde se localiza el DNA cromosomal,¹⁹ cambian de manera importante en las células con baja capacidad energética como son las células en FS.^{3,28,31} En estas células no se puede mantener la tensión helicoidal o superenrollamiento necesario para el metabolismo del DNA.^{20,49} En el nucleóide de las bacterias se encuentran presentes las DNA topoisomerasas y polimerasas, la RNA polimerasa y una serie de proteínas pequeñas que participan en la organización y nivel de superenrollamiento del DNA y en la regulación de un número importante de genes.^{19,31} Las principales proteínas pequeñas del nucleóide son Fis, HU y su paróloga IHF, y H-NS y su paróloga StpA. En la FE el número de moléculas de HU y Fis por célula es aproximadamente 30,000, mientras que el de las otras proteínas es alrededor de 10,000. En esta fase la proteína Dps, una proteína de unión inespecífica al DNA con un dominio tipo ferritina, tiene 500 copias por célula.³¹ En la FS la composición del nucleóide se modifica de manera crítica. Fis y HU disminuyen respectivamente a 1,000 y 16,000 en la FS temprana, y a 100 y 7,500 moléculas por célula en la tardía. Por otra parte, Dps aumenta consecutivamente a 10,000 y 15,000. El número de las otras proteínas del nucleóide muestra fluctuaciones, pero en general tiende a disminuir en la FS tardía.³¹ Las proteínas del nucleóide que presentan un mayor cambio de concentración en relación a la fase de crecimiento son Fis y Dps. Fis es una proteína necesaria para el inicio del crecimiento exponencial, mientras que Dps contribuye a incrementar la resistencia de las células en FS al estrés oxidativo.^{4,39} Los cambios en el nucleóide de FS se acompañan de una reorganización de la molécula de DNA y de un cambio global en el patrón de expresión genética. El DNA pasa de una organización dinámica característica de la FE, en la que el superenrollamiento global y de regiones específicas cambia constantemente, a una estructura cuasi-cristalina.^{42,57} A diferencia de la organización de la FE, la co-cristalización de Dps y el DNA no requiere aporte de energía para su forma-

ción y mantenimiento. El DNA en el co-cristal está protegido de la oxidación y de las nucleasas. Además Dps atrapa hierro, lo que disminuye la reacción de Fenton y con ello la generación de radicales libres.⁴² En la protección del DNA participan también enzimas y metabolitos, así como otros mecanismos que no se conocen bien.

E. coli produce una molécula, no identificada, que incrementa su concentración en el medio de cultivo de manera proporcional al número de bacterias. Cuando la densidad celular es alta y los nutrientes se agotan, esta concentración alcanza un umbral que induce la inhibición del inicio de la replicación de las células del cultivo.⁵⁶ La regulación genética dependiente de la densidad celular e inducida por un factor extracelular se denomina "quorum sensing". Esto implica que las células en FS son incapaces de reiniciar la replicación. Sin embargo, es importante anotar que a la fecha no se ha identificado la molécula señal y su receptor. Actualmente se cuestiona la existencia de la regulación genética tipo "quorum sensing" en *E. coli*. Esta bacteria no sintetiza las moléculas señal comúnmente utilizada por otras bacterias gram negativas (*Vibrio*, *Pseudomonas*), aunque se propone que tiene los receptores para estas señales y puede responder genéticamente a su presencia.¹

En resumen, en las células en FS el DNA se relaja, cambia la composición de proteínas del nucleóide y el DNA co-cristaliza con la proteína Dps, se presenta un fenómeno similar al "quorum sensing" que inhibe la iniciación de la replicación del DNA y en general el metabolismo del DNA disminuye de manera importante.

IV. Transcripción y traducción

Las maquinarias de transcripción y traducción se modifican cuando las células entran a la FS.²⁸ Como ya se mencionó, en estas células se presenta una disminución general de la expresión genética. La mayoría de los genes importantes para mantener a las células dividiéndose activamente disminuyen su transcripción y aumenta la de un conjunto de aproximadamente 250 genes que codifican para funciones que mantienen la viabilidad de las células en condiciones de ayuno.⁵⁵ Este cambio en el patrón de transcripción de la célula depende principalmente del reemplazo del factor de transcripción σ^{70} en la enzima RNA polimerasa por σ^s .^{21,23,28} El factor σ^{70} media la transcripción de la mayoría de los genes importantes para un crecimiento activo, mientras que σ^s es un regulador que incrementa su actividad en respuesta al estrés nutricional y a otras condiciones como el daño al DNA, el choque osmótico y la disminución del pH.^{23,24,32,55} Los mecanismos de regulación de la actividad de σ^s operan a diferentes niveles: transcripción y traducción de *rpoS*, y vida media y actividad de σ^s . En esta regulación intervienen proteínas, moléculas pe-

queñas de RNA, la alarmona ppGpp, polifosfatos, UDP-glucosa y reguladores globales como H-NS y cAMP-CRP.²⁵ La participación de este repertorio de moléculas, proteínas y RNA reguladores en el control de la actividad de σ^s sugiere una compleja arquitectura de regulones interconectados. Esta interconexión permite un espectro de respuestas celulares y poblacionales rápidas y eficientes ante los cambios ambientales que enfrenta *E. coli*.

En cuanto a la traducción, se sabe que el uso de inhibidores de la síntesis de proteínas en el ingreso a la FS disminuye la capacidad de supervivencia de *E. coli* en periodos largos de ayuno.⁴⁵ Tal observación sugiere que la síntesis de ciertas proteínas al ingreso a la FS es crítica para la supervivencia celular a largo plazo. Una vez que se establece la FS, la traducción disminuye principalmente por la formación de dímeros de ribosomas 70S. Los dímeros, o ribosomas 100S, se generan por la unión de la proteína RMF (Ribosome Modulation Factor) a los 70S.⁵⁴ RMF cubre el centro de la peptidil-transferasa y el túnel de salida del péptido, por lo que los ribosomas 100S son inactivos.⁵⁹ Esta unión es reversible, de manera que al presentarse nutrientes en el cultivo los ribosomas 100S rápidamente se monomerizan en 70S. En la FS la poza total de ribosomas disminuye por la degradación de sus proteínas; sin embargo, una fracción se mantiene activa para la traducción de las proteínas características de la FS y otra se inactiva reversiblemente al dimerizarse. En la FS, además de la degradación y dimerización de ribosomas, disminuye la fidelidad de la traducción, lo que produce un número importante de proteínas aberrantes.⁷ En la FS, los sistemas antitoxina-toxina *relBE* o *mazEF* podrían contribuir a disminuir la traducción de algunos genes y favorecer la de otros, así como a generar un estado bacterioestático.¹⁸

Los patrones de transcripción y traducción de las células de FS se modifican en función del tiempo de ayuno. Esto muestra que la composición molecular de las maquinarias de transcripción y síntesis de proteínas, así como la concentración de moléculas y factores que regulan su actividad, cambian a lo largo de la FS.

V. Los genes que modifican su expresión en la fase estacionaria

Como se mencionó, FS es un término operacional que no describe un estado fisiológico fijo o una respuesta particular. Las características de las células en esta fase varían en función del tiempo de ayuno, del primer nutriente que se agota, de la cepa y de las condiciones del cultivo. Estas variaciones dificultan la integración de un modelo general de los mecanismos de regulación de la expresión genética en la FS. Sin embargo, los estudios de los últimos 15 años sobre la FS de *E. coli* en medio rico y mínimo-

glucosa, han permitido un avance importante en la comprensión general de la FS de las bacterias. Inicialmente, los enfoques genéticos y bioquímicos permitieron el descubrimiento de la subunidad σ^s (RpoS) de la RNA polimerasa y su identificación como modulador maestro de un regulón de la FS. Asimismo, se determinó la interacción de este factor transcripcional con otros reguladores globales.²³⁻²⁵ Actualmente la caracterización del regulón σ^s se ha ampliado con las metodologías de la genómica.^{35,47,53,55} Los principales análisis genómicos se basan en la comparación de los perfiles de expresión de fusiones aleatorias entre las regiones reguladoras de genes no esenciales y el gene *lacZ* y del análisis del RNA total (transcriptoma) y de las proteínas totales (proteoma) de células silvestres y mutantes en *rpoS*. Con estos análisis se pretende dilucidar los cambios en el tiempo de los patrones de expresión genética, los estímulos que inducen estos cambios y las consecuencias metabólicas para la célula (metaboloma). Actualmente se tiene el catálogo de los principales genes de *E. coli* cuya expresión se modifica por la presencia o ausencia de *rpoS* en el ingreso y en el periodo temprano de la FS. Los estudios de las células de más de 10 días en FS se complican por la presencia de mutantes GASP, que tienen un metabolismo activo y se dividen en el cultivo.^{15,60} Asimismo, existe poca información de la FS de cultivos en los que se agota primero el fósforo o el nitrógeno, de cultivos en anaerobiosis y de cultivos en presencia de otros géneros bacterianos. Sin embargo, en este momento se puede proponer un patrón general de expresión

genética de *E. coli* al inicio y durante la FS temprana en medio rico LB y medio mínimo-glucosa.

El número de genes que modifican su expresión durante la FS varía de acuerdo a la metodología, la cepa bacteriana (MG1655, MC4100 o W3110), el medio de cultivo (LB o mínimo-glucosa) y la duración de la FS. Este número es diferente si se consideran todos los genes o exclusivamente aquellos que son σ^s -dependientes. Por lo tanto, el número fluctúa entre un mínimo de 50 y un máximo de 250. Los genes σ^s -dependientes, a su vez, se clasifican en dos grupos: los que dependen directamente de la cantidad y actividad de σ^s , y aquellos cuya expresión depende de este factor y de una proteína reguladora. El factor σ^s forma una red modular con reguladores de respuesta a la disminución de nutrientes específicos como son cAMP/CRP (carbono), NtrB/NtrC/ σ^{54} (nitrógeno) y PhoB/PhoR (fosfato).³⁵ Además, σ^s es importante para la expresión de una fracción importante de los genes regulados por Lrp (leucine-responsive regulatory protein)⁴³ y de los genes de la respuesta a daño en el DNA, estrés ácido y estrés osmótico.^{24,32,55} Esto sugiere que estas proteínas reguladoras imponen diferentes patrones de expresión a varios subgrupos de genes del regulón σ^s .

En la Tabla 1 se muestra una selección de los genes cuya expresión se incrementa en la FS. En esta selección los genes se agrupan de acuerdo a las categorías propuestas por Mónica Riley.⁵⁰ En la categoría de genes relacionados con la forma de las células y la división celular se encuentra *bolA*, que codifica para un regulador transcripcional que activa la expresión de las D, D carboxipeptidasas

Tabla 1. Genes de *E. coli* que incrementan su transcripción en fase estacionaria.

Categoría funcional	Genes
Morfología y división celular	<i>bolA</i> , <i>ftsQ</i> , <i>ftsA</i> , <i>ftsZ</i> <i>csgA</i> , <i>csgB</i> , <i>cfa</i> , <i>ybaY</i>
Metabolismo energético	<i>appB</i> , <i>appY</i> , <i>narY</i> , <i>idcC</i> , <i>acnA</i> , <i>acs</i> , <i>aldB</i> , <i>cydA</i> , <i>cydB</i> , <i>cyxAB</i> , <i>frdA</i> , <i>glpD</i> , <i>hmp</i> , <i>nrz</i> , <i>poxB</i> , <i>tam</i> , <i>hyaABCDE</i> , <i>galEKT</i> , <i>adhP</i> , <i>amyA</i> , <i>dkgB</i> , <i>fbaB</i> , <i>gabD</i> , <i>hdhA</i> , <i>hycF</i> , <i>idcC</i> , <i>narU</i> , <i>narY</i> , <i>poxB</i> , <i>qor</i> , <i>talA</i> , <i>tktB</i> , <i>ufp</i> , <i>crp</i> , <i>fbaB</i> , <i>gip</i> , <i>nagB</i> , <i>pfkB</i>
Metabolismo y biosíntesis de aminoácidos	<i>argH</i> , <i>aroM</i> , <i>astC</i> , <i>astA</i> , <i>astD</i> , <i>astB</i> , <i>astE</i> , <i>adiA</i> , <i>gadA</i> , <i>gadB</i> , <i>gadC</i> , <i>aroL</i> , <i>ilvD</i> , <i>tnaA</i>
Resistencia al estrés	<i>dps</i> , <i>osmA</i> , <i>osmB</i> , <i>osmC</i> , <i>osmE</i> , <i>osmY</i> , <i>katE</i> , <i>katG</i> , <i>yhiU</i> , <i>yhiV</i> , <i>mltB</i> , <i>ecnB</i> , <i>ahpCF</i> , <i>cpxRA</i> , <i>gor</i> , <i>ldc</i> , <i>oxyR</i> , <i>pcm</i> , <i>pspADCE</i> , <i>sodC</i> , <i>sprA</i> , <i>otsA</i> , <i>otsB</i> , <i>trfF</i> , <i>bfr</i> , <i>uspB</i>
Replicación, reparación, recombinación y modificación del DNA, y configuración del nucleóide	<i>hns</i> , <i>ada</i> , <i>aidB</i> , <i>cbpA</i> , <i>dnaN</i> , <i>himD</i> , <i>rob</i> , <i>topA</i> , <i>xthA</i>
Transporte y membrana	<i>ugpC</i> , <i>ugpE</i> , <i>gabP</i> , <i>artM</i> , <i>artI</i> , <i>artP</i> , <i>ansP</i> , <i>blc</i> , <i>mscL</i> , <i>ugpB</i> , <i>ugpC</i> , <i>potF</i> , <i>rpoS</i> , <i>chaB</i> , <i>gadE</i> , <i>gadW</i> , <i>gadX</i> , <i>gem</i> , <i>aroM</i> , <i>ybaY</i> , <i>ybaS</i> , <i>ycdS</i> , <i>yehX</i> , <i>yhJY</i> , <i>yfcG</i> , <i>ylil</i> , <i>yjbJ</i> , <i>yjbE</i> , <i>ygaU</i> , <i>ygdI</i> , <i>ygaF</i> , <i>yjgR</i> , <i>ydaM</i> , <i>ydcK</i> , <i>yafN</i> , <i>ybgA</i> , <i>ybjP</i> , <i>ydiZ</i> , <i>yngA</i> , <i>ydel</i> , <i>xasA</i>

La información de la tabla se obtuvo de las referencias 29, 35, 47, 52, 53, 55 y 58.

En letras oscuras se indican los genes con un promotor de tipo σ^s , verificado experimentalmente.

PBP5 y PBP6. Estas proteínas participan en la biosíntesis de la pared celular y en el cambio de la forma de bacilo de *E. coli* en FE a la cocoide de la FS. En la categoría de genes que permiten la resistencia celular a condiciones adversas están: *dps*, que codifica a la proteína Dps; *gadA* y *gadB*, para la glutamato descarboxilasa y la glutamato reductasa, respectivamente; *kate*, para la catalasa o hidroxidasa II, y *otsA*, para la trehalosa-6-fosfato sintasa. Por ejemplo, la proteína Dps forma una estructura cristalina con el DNA, la catalasa convierte al peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, mientras la trehalosa-6-fosfato sintasa participa en la síntesis de la trehalosa. Las dos primeras proteínas contribuyen a proteger a la célula del estrés oxidativo, mientras que la trehalosa protege del estrés calórico y del estrés osmótico. En esta misma categoría están los genes *osmB*, *osmC* y *osmY* que codifican, respectivamente, para una lipoproteína, una proteína de membrana externa y una proteína periplasmática que responden a cambios en la osmolaridad. Otro grupo de genes se relaciona con el metabolismo energético y la utilización de aminoácidos: *poxB* (piruvato deshidrogenasa/oxidasa), *tktB* (transcetolasa 2), *tnaA* (triptofanasa), y *artP* y *artM*, cuyos productos son componentes del transportador de arginina. De este grupo, la piruvato deshidrogenasa/oxidasa parece tener un papel importante en la transición de condiciones aeróbicas a anaeróbicas. La triptofanasa, que degrada triptófano a indol, piruvato y amonio, permite la utilización de este aminoácido como fuente de carbono, nitrógeno y energía. El indol es un metabolito que además podría funcionar como una señal célula-célula y participar en la regulación de algunos genes. En la Tabla 1 se muestra también un número importante de genes de los cuales no se conoce su función, o bien se les asigna una función hipotética. Por ejemplo, *ycdS* es una posible proteína de transporte y *ybaS* una posible glutaminasa.

En la Tabla 2 se presenta una selección de los genes cuya expresión disminuye en la FS. Entre los más importantes están los genes necesarios para la estructura y funcionamiento de los flagelos (*flgM*, *flgA*, *flgB*, *flgE*, *flgI*, *fliC*, y *fliN*), la ma-

yoría de los genes de las enzimas del ciclo de Krebs (*sdhA*, *sdhB*, *sdhC*, *fumA*, *mdh*, *gltA*, *acnB*, *lpdA*, *icdA*, *sucA* y *sucB*), los de la sintetasa de ATP (*atpIBEFHAGDC*) y los genes para las proteínas ribosomales de las subunidades 50S (*rplABCD-JKMPQRSVW* y *rpmC*) y 30S (*rpsABCEFGKMNOPQ*) del ribosoma. La disminución en la expresión de los genes flagelares explica la disminución en el número de flagelos que se observa en las células de FS; mientras que la de los genes del metabolismo energético explica en parte el redireccionamiento metabólico hacia un metabolismo basado en la respiración anaerobia y/o fermentativa. El decremento en la expresión de los genes para las proteínas ribosomales y la degradación de estas proteínas, contribuyen a la disminución del número de ribosomas en la FS.

El conocimiento actual de la regulación genética de *E. coli* en la FS permite proponer un modelo general de regulación para las bacterias que no esporulan. En las células en FS se activa una red modular de genes en la que participan diversos reguladores genéticos. La expresión de esta red se orienta principalmente a: a) mantener la integridad del DNA y la de una fracción de las macromoléculas celulares (ribosomas, membrana, pared); b) almacenar moléculas de reserva; c) degradar macromoléculas para enriquecer el medio interno y externo de nutrientes alternativos; d) generar un ambiente externo que favorece la selección de mutantes GASP;^{15,60} e) incrementar la resistencia general de la célula a otras condiciones adversas; y f) reorganizar el metabolismo general de la célula para adecuarlo a las condiciones de ayuno y a la utilización de nutrientes no preferenciales. En el caso de *E. coli*, una bacteria Gram negativa facultativa, los mecanismos de protección se orientan principalmente a la prevención del daño oxidativo. Por ejemplo, el metabolismo aeróbico cambia a uno anaeróbico y aumentan las enzimas como la catalasa; por otra parte, la proteína Dps aumenta su concentración y co-cristaliza con el DNA para protegerlo de la oxidación.

En resumen, durante la FS los cambios en la expresión genética implican una reorganización metabólica profunda. Mediante esta reorganización se mantiene la integridad

Tabla 2. Genes de *E. coli* que disminuyen su transcripción en fase estacionaria.

Categoría funcional	Genes
Metabolismo energético	<i>sdhA</i> , <i>sdhB</i> , <i>sdhC</i> , <i>fumA</i> , <i>mdh</i> , <i>pckA</i> , <i>gltA</i> , <i>acnB</i> , <i>abgB</i> , <i>aceE</i> , <i>aceF</i> , <i>lpdA</i> , <i>icdA</i> , <i>sucA</i> , <i>sucB</i> , <i>atpIBEFHAGDC</i>
Síntesis flagelar	<i>flgM</i> , <i>flgA</i> , <i>flgB</i> , <i>flgC</i> , <i>flgD</i> , <i>flgE</i> , <i>flgF</i> , <i>flgG</i> , <i>flgH</i> , <i>flgI</i> , <i>fliE</i> , <i>fliC</i> , <i>fliF</i> , <i>fliG</i> , <i>fliH</i> , <i>fliK</i> , <i>fliZ</i> , <i>fliD</i> , <i>fliS</i> , <i>fliL</i> , <i>fliM</i> , <i>fliN</i> , <i>fliB</i> , <i>flgM</i> , <i>flgN</i> , <i>flgK</i> , <i>flgL</i>
Transporte y membrana	<i>nmpC</i> , <i>ompF</i> , <i>ompW</i>
Resistencia al estrés	<i>uspE</i> ,
Regulación	<i>fnr</i> , <i>fliA</i>

La información de la tabla proviene de las referencias 47 y 58.

celular y la de las principales macromoléculas y aumenta la resistencia celular a diferentes agentes nocivos físicos y químicos durante el ayuno.

PERSPECTIVAS

La bacteria *E. coli* es posiblemente el organismo del cual se tiene más información a nivel genético, bioquímico y fisiológico. Basta recordar que en 1961 se describió el primer sistema de regulación genética: el operón *lac* de *E. coli*.³⁰ El banco de cepas mutantes, *E. coli* Genetic Stock Center, lo inició Bárbara Bachmann alrededor de 1972,⁶ mientras que los primeros ensayos de proteoma datan de 1980⁸ y el primero de un microarreglo de 1987.³³ Si bien a la fecha se ha secuenciado un gran número de genomas, en el caso de *E. coli* se cuenta con la información más completa y detallada de la función y regulación de muchos de sus genes, así como de sus vías metabólicas y redes modulares globales de regulación genética. La base de datos de *E. coli*, EcoCyc (<http://ecocyc.org>) permite la integración de la información bioquímica y genética de esta bacteria y provee la bibliografía correspondiente. El regulón DB de EcoCyc (http://www.cifn.unam.mx/Computational_Genomics/regulondb/) es una base de datos generada y actualizada por el grupo de J. Collado de México.⁴⁸ En esta base se encuentra la información de las regiones reguladoras de los genes y operones de *E. coli* (promotores y sitios de reconocimiento para las proteínas reguladoras), los genes que responden a cada una de las proteínas reguladoras conocidas (regulones), así como las interconexiones entre los diferentes regulones. Idealmente este sitio permitirá modelar una cibercélula en un futuro próximo. En esta cibercélula se podrá explorar *in silico* el transcriptoma, el proteoma, el metaboloma, y el “reguloma” de una célula en diferentes condiciones.

En este contexto, el estudio de la FS en *E. coli* ha contribuido a establecer un marco de referencia, tanto conceptual como metodológico, para abordar el estudio de los sistemas globales de regulación de bacterias que operan en respuesta a los cambios del ambiente. Sin embargo, este estudio es incompleto; por ejemplo, la información de la FS en condiciones de anaerobiosis o de privación de diferentes nutrientes es escasa y se cuenta únicamente con la propuesta de un metaboloma para células en FS de cultivos biotecnológicos de alta densidad celular.⁵⁸ Actualmente no se tiene una visión evolutiva de las redes de regulación y de los genes que se activan o reprimen en la FS de las bacterias que no esporulan. En particular, sería importante decifrar estas redes en bacterias aeróbicas, anaeróbicas y otras facultativas, en bacterias extremófilas y en bacterias de vida libre, intracelulares o, como *E. coli*, de vida libre que alterna con el hábitat de un hospedero. En este contexto es importante también el estudio de la FS de arqueas y organismos eucariotes unicelulares.

Los estudios que utilizan a *E. coli* como modelo bacteriano se insertan en la corriente actual del pensamiento sobre los fenómenos biológicos a nivel molecular. La visión reduccionista de estos fenómenos, necesaria en el nacimiento de la biología molecular y que permitió un impresionante avance de la biología en la segunda mitad del siglo XX, se mueve ahora hacia una visión más integrativa. Esta visión es cada vez más accesible gracias al avance de aquellas metodologías que permiten el análisis simultáneo de la expresión de todos los genes de un genoma y al enfoque multidisciplinario de los fenómenos biológicos complejos. En este horizonte, la bacteria *E. coli* sigue siendo un modelo importante de la biología del siglo XXI.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (Donativo 36984-N).

REFERENCIAS

- Ahmer, B. M. M. 2004. Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* 52:933-945.
- Akerlund, T., K. Nordström & R. Bernander. 1995. Analysis of cell size and DNA content in exponentially growing and stationary-phase batch cultures of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177:6791-6797.
- Ali Azam, T., A. Iwata, A. Nishimura, S. Ueda & A. Ishihama. 1999. Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J. Bacteriol.* 181:6361-6370.
- Almirón, M., A. J. Link, D. Furlong & R. Kolter. 1992. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes and Development* 6:2646-2654.
- Amitai, S., Y. Yassin & H. Engelberg-Kulka. 2004. MazF-mediated cell death in *Escherichia coli*: a point of no return. *J. Bacteriol.* 186:8295-8300.
- Bachmann, B. J. 1972. Pedigrees of some mutants strains of *Escherichia coli* K12. *Bacteriol. Rev.* 36:525-557.
- Barak, Z., J. Gallant, D. Lindsley, B. Kwieciszewski & D. Heidel. 1996. Enhanced ribosome frameshifting in stationary phase cells. *J. Mol. Biol.* 263:140-148.
- Bloch, P. L., T. A. Phillips & F. C. Neidhardt. 1980. Protein identification on O'Farrell two-dimensional gels: Locations of 81 *Escherichia coli* proteins. *J. Bacteriol.* 141:1409-1420.
- Cairns, J. & P. L. Foster. 1991. Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli*. *Genetics* 128:695-701.
- Cuny, C., L. Dukan, L. Frayssé, M. Ballesteros & S. Dukan. 2005. Investigation of the first events leading to loss of culturability during *Escherichia coli* starvation: Future non culturable bacteria form a subpopulation. *J. Bacteriol.* 187:2244-2248.
- Desnues, B., C. Cuny, G. Grégori, S. Dukan, H. Aguilaniu & T. Nyström. 2003. Differential oxidative damage and expression of stress defence regulons in culturable and non-culturable *Escherichia coli* cells. *EMBO Rep.* 4:400-404.
- Engelberg-Kulka, H. & G. Glaser. 1999. Addition modules and programmed cell death and antideath in bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* 53:43-70.
- Ericsson, M., D. Hanstorp, P. Hagberg, J. Enger & T. Nyström. 2000. Sorting out bacterial viability with optical tweezers. *J. Bacteriol.* 182:5551-5555.

14. Farrell, M. J. & S. E. Finkel. 2003. The growth advantage in stationary-phase phenotype conferred by *rpoS* mutations is dependent on the pH and nutrient environment. *J. Bacteriol.* 185:7044-7052.
15. Finkel, S. E., E. R. Zinser & R. Kolter. 2000. Long-term survival and evolution in the stationary phase, pp.231-238. In G. Storz & R. Hengge-Aronis (Eds). *Bacterial Stress Responses*, American Society for Microbiology, Washington D.C.
16. Foster, P. L. 2004. Adaptive mutation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186:4846-4852.
17. García del Portillo, F., A. G. Pisabarro, E. J. de la Rosa & M. A. de Pedro. 1987. Modulation of cell wall synthesis by DNA replication in *Escherichia coli* during initiation of cell growth. *J. Bacteriol.* 169:2410-2416.
18. Gerdes, K. 2000. Toxin-antitoxin modules may regulate synthesis of macromolecules during nutritional stress. *J. Bacteriol.* 182:561-572.
19. Gómez-Eichelmann, M. C. & R. Camacho-Carranza. 1995. El nucleóide bacteriano. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 37:281-290.
20. Gómez-Eichelmann, M. C. & R. Camacho-Carranza. 1995. El superenrollamiento del DNA y topoisomerasas en *Escherichia coli*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 37:291-304.
21. Goodrich-Blair, H., M. Uría-Nickelsen & R. Kolter. 1996. Regulation of gene expression in stationary phase, pp. 571-583. In E. C. C. Lin & A. Simon Lynch (Eds). *Regulation of Gene Expression in Escherichia coli*, R. G. Landes Co. N.Y.
22. Hayes, F. 2003. Toxin-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science* 301:1496-1499.
23. Hengge-Aronis, R. 1999. Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:148-152.
24. Hengge-Aronis, R. 2000. The general stress response in *Escherichia coli*, pp. 161-178. In G. Storz & R. Hengge-Aronis (Eds). *Bacterial Stress Responses*, American Society for Microbiology, Washington D.C.
25. Hengge-Aronis, R. 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the σ^s (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:373-395.
26. Hughes, D. & D. I. Andersson. 1997. Carbon starvation of *Salmonella typhimurium* does not cause a general increase of mutation rates. *J. Bacteriol.* 179:6688-6691.
27. Huisman, G. W., D. A. Siegle, M. Zambrano & R. Kolter. 1996. Morphological and physiological changes during stationary phase, pp. 1672-1682. In F.C. Neidhardt (Ed.). *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, American Society for Microbiology, Washington D.C.
28. Ishihama, A. 1999. Modulation of the nucleoid, the transcription apparatus, and the translation machinery in bacteria for stationary phase survival. *Genes to Cells* 4:135-143.
29. Ishihama, A. 2000. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:499-518.
30. Jacob, F. & J. Monod. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3:318-356.
31. Johnson, R. C., L. M. Johnson, J. W. Schmidt & J. F. Gardner. 2005. Major nucleoid proteins in the structure and function of the *Escherichia coli* chromosome, pp. 65-132. In N. Patrick Higgins (Ed.). *The Bacterial Chromosome*, American Society for Microbiology, Washington D.C.
32. Khil, P. P. & D. Camerini-Otero. 2002. Over 1000 genes are involved in the DNA damage response of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 44:89-105.
33. Kohara, Y., K. Akiyama & K. Isono. 1987. The physical map of the whole *Escherichia coli* chromosome: Application of a new strategy for rapid analysis and sorting of a large genomic library. *Cell* 50:495-508.
34. Kolter, R., D. A. Siegle & A. Tormo. 1993. The stationary phase of the bacterial cycle. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:855-74.
35. Lacour, S. & P. Landini. 2004. σ^s -dependent gene expression at the onset of stationary phase in *Escherichia coli*: Function of σ^s -dependent genes and identification of their promoter sequences. *J. Bacteriol.* 186:7186-7195.
36. Loewe, L., V. Textor & S. Scherer. 2003. High deleterious genomic mutation rate in stationary phase of *Escherichia coli*. *Science* 302:1558-1560.
37. Makinoshima, H., S.-I. Aizawa, H. Hayashi, T. Miki, A. Nishimura & A. Ishihama. 2003. Growth phase-coupled alterations in cell structure and function of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 185:1338-1345.
38. Makinoshima, H., A. Nishimura & A. Ishihama. 2002. Fractionation of *Escherichia coli* cell populations at different stages during growth transition to stationary phase. *Mol. Microbiol.* 43:269-279.
39. Martínez, A. & R. Kolter. 1997. Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *J. Bacteriol.* 179: 5188-5194.
40. Membrillo-Hernández, J., A. Nuñez-de la Mora, T. del Río-Albrechtsen, R. Camacho-Carranza & M. C. Gómez-Eichelmann. 1995. Thermally-induced cell lysis in *Escherichia coli* K12. *J. Basic Microbiol.* 35:45-50.
41. Miller, J. H. 1992. A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
42. Minsky, A. & R. Kolter. 2005. Stationary-phase chromosomes, pp. 155-166. In N. Patrick Higgins (Ed.). *The Bacterial Chromosome*. American Society for Microbiology, Washington D.C.
43. Newman, E. B. & R. Lin. 1996. The leucine/Lrp regulon, pp. 419-433. In E. C. C. Lin, A. S. Lynch (Eds.). *Regulation of gene expression in Escherichia coli*. R. G. Landes Co. and Chapman & Hall, U.S.A.
44. Nyström, T. 2004. Stationary-phase physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 58:161-181.
45. Nyström, T., K. Flärdh & S. Kjelleberg. 1990. Responses to multiple-nutrient starvation in marine *Vibrio* sp. Strain CCUG 15956. *J. Bacteriol.* 172:7085-7097.
46. Pandey, D. P. & K. Gerdes. 2005. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* 33:966-976.
47. Patten, C. L., M. G. Kirchof, M. R. Schertzberg, R. A. Morton & H. E. Schellhorn. 2004. Microarray analysis of RpoS-mediated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genomics* 272:580-591.
48. Resendis-Antonio, O., J. A. Freyre-González, R. Menchaca-Méndez, R. M. Gutiérrez-Ríos, A. Martínez-Antonio, C. Ávila-Sánchez & J. Collado-Vides. 2005. Modular analysis of the transcriptional regulatory network of *Escherichia coli*. *TRENDS in Genet.* 21:16-20.
49. Reyes-Domínguez, Y., G. Contreras-Ferrat, J. Ramírez-Santos, J. Membrillo-Hernández & M. C. Gómez-Eichelmann. 2003. Plasmid DNA supercoiling and gyrase activity in *Escherichia coli* wild-type and *rpoS* stationary-phase cells. *J. Bacteriol.* 185:1097-1100.
50. Riley, M. & M. H. Serres. 2000. Interim report on genomics of *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:341-411.
51. Rosenberg, S.M. & P. J. Hastings. 2004. Adaptive point mutation and adaptive amplification pathways in the *Escherichia coli* Lac system: Stress responses producing genetic change. *J. Bacteriol.* 186:4838-4843.
52. Taní, T. H., A. Khodursky, R. M. Blumenthal, P. O. Brown & R. G. Matthews. 2002. Adaptation to famine: A family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:13471-13476.
53. Vijayakumar, S. R. V., M. G. Kirchof, C. L. Patten, & H. E. Schellhorn. 2004. RpoS-regulated genes of *Escherichia coli* identified by random *lacZ* fusion mutagenesis. *J. Bacteriol.* 186:8499-8507.

54. Wada, A. 1998. Growth phase coupled modulation of *Escherichia coli* ribosomes. *Genes to Cells* 3:203-208.
55. Weber, H., T. Polen, J. Heuveling, V. F. Wendisch & R. Hengge. 2005. Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: σ^s -dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J. Bacteriol.* 187:1591-1603.
56. Withers, H. L. & K. Nordström. 1998. Quorum-sensing acts at initiation of chromosomal replication in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:15694-15699.
57. Wolf, S. G., D. Frenkiel, T. Arad, S. E. Finkel, R. Kolter & A. Minsky. 1999. DNA protection by stress-induced biocrystallization. *Nature* 400:83-85.
58. Yoon, S. H., M.-J. Han, S. Y. Lee, K. J. Jeong & J.-S. Yoo. 2003. Combined transcriptome and proteome analysis of *Escherichia coli* during high cell density culture. *Biotechnol. and Bioengineering* 81:753-767.
59. Yoshida, H., H. Yamamoto, T. Uchiumi & A. Wada. 2004. RMF inactivates ribosomes by covering the peptidyl-transferase centre and entrance of peptide exit tunnel. *Genes Cells* 9:271-278.
60. Zambrano, M. M. & R. Kolter. 1996. GASping for life in stationary phase. *Cell* 86:181-184.

Correspondence to:

M. Carmen Gómez Eichelmann

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología,
Instituto de Investigaciones Biomédicas,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Apdo Postal 70-228,
04510 México, D. F. México.
Tel. 5622-3852 FAX 5622-3855
E-mail: cargom@servidor.unam.mx