



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**“AUMENTO DE LA TOLERANCIA A DESECACIÓN DE  
*Pseudomonas putida* cepa KT2440 MEDIANTE  
ESTRATEGIAS DE ADAPTACIÓN A ESTRÉS OXIDATIVO”**

**Tesis que para obtener el título de  
LICENCIADO (A) EN BIÓLOGIA**

**PRESENTA:**

**MARISOL PATRICIA VÁZQUEZ QUIROZ**

**DIRECTOR:**

**D.C. ANTONINO BÁEZ ROGELIO**

**NOVIEMBRE DEL 2016**



## 1.- AGRADECIMIENTOS

El trabajo de tesis fue posible gracias al apoyo del proyecto NPTC-BUAP-PTC 382.

En primer lugar le agradezco a mi familia por su apoyo, cariño y considerable paciencia. A mi tutor de tesis el D.C. Antonino Báez Rogelio por su enorme paciencia para ayudarme con mis dudas y corregir mis errores, lo cual permitió la culminación del trabajo de investigación.

Le agradezco mucho a la Dra. Lorena Milflores Flores por hacerme un huequito entre todas sus actividades y aceptar ser parte de mi jurado, por revisar y hacer sus importantes observaciones en mi tesis.

Con gran estima le agradezco enormemente a la M. C. Dalia Molina Romero por ser parte de mi jurado de revisión de tesis, presentarme a mi tutor de tesis, por su infinita paciencia para enseñarme durante mi formación, por permitirme aprender durante su trabajo de investigación y compartir sus conocimientos, además de ayudarme durante mi proceso de titulación. También le doy las gracias al D.C. Jesús Muñoz Rojas por abrirme las puertas de su laboratorio para hacer mi investigación.

Le agradezco a Lesther Emmanuel López Cruz por su paciencia para enseñarme a montar y monitorear los experimentos.

A mis compañeros del Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana: Osvaldo, Ana Laura, Fernando, Lilia, Elizabeth, Raúl.

A mis compañeros y amigos de la universidad: Gustavo Arellano, Ricardo Vera, Magaly, Claudia Barranco, Ricardo Monterrosas.

A mis amigas: Abigail Cortez, Montze Juárez e Isis Meneses.

Y a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por mi educación.

<b>1.- AGRADECIMIENTOS</b> .....	1
<b>2.- ÍNDICE</b> .....	2
<b>3.- RESÚMEN</b> .....	4
<b>4.- ABREVIATURAS</b> .....	5
<b>5.- INTRODUCCIÓN</b> .....	6
5.1- Problemas ambientales y alimentación.....	6
5.2- Inoculantes microbianos.....	6
5.3- Bacterias PGPR.....	7
5.4- <i>Pseudomona putida</i> KT2440.....	10
5.5- Deseccación.....	12
5.6- Evolución Adaptativa.....	14
<b>6.- ANTECEDENTES</b> .....	15
<b>7.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	18
<b>8.- JUSTIFICACIÓN</b> .....	18
<b>9.- HIPÓTESIS</b> .....	19
<b>10.- OBJETIVOS</b> .....	19
- OBJETIVO GENERAL	
- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
<b>11.- MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	20
<b>12.- RESULTADOS</b> .....	25
<b>13.- DISCUSIÓN</b> .....	35
<b>14.- CONCLUSIÓN</b> .....	36

15.- REFERENCIAS.....37

16.- ANEXOS.....46

### 3.- RESÚMEN

El constante aumento de la temperatura, la sobreexplotación de las tierras de cultivo y el incremento poblacional ha generado un impacto negativo en muchos ecosistemas. La demanda global de alimentos continua en constante aumento y para satisfacerla se han buscado alternativas sustentables. La producción de alimentos mediante sistemas agrícolas menos nocivos para el ambiente resulta de gran interés para la agricultura moderna. Así, el uso de inoculantes con bacterias promotoras de crecimiento de plantas (PGPB) ha demostrado ser una estrategia efectiva y amigable con el medio ambiente; sin embargo las condiciones de almacenamiento y transporte de estos productos así como las variaciones de temperatura de las zonas de cultivo donde serán aplicados repercuten fuertemente en la viabilidad de las bacterias benéficas y por tanto en la efectividad de éstos productos. Las condiciones de desecación que experimentan los inoculantes microbianos en los campos de cultivo son la principal limitante de su éxito; por consiguiente la elaboración de inoculantes robustos que mantengan su efectividad pese a factores de estrés como la desecación es de gran relevancia.

*Pseudomonas putida* KT2440 es capaz de eliminar compuestos xenobióticos y exhibe una alta capacidad de colonizar la rizosfera de un gran número de plantas; sin embargo para ser empleada como inoculante en zonas áridas es necesario incrementar su tolerancia a desecación, por lo que el objetivo del presente trabajo fue el desarrollar un fenotipo de *Pseudomonas putida* KT2440 tolerante al proceso de desecación mediante dos estrategias: la adaptación a estrés oxidativo, debido a que la oxidación es un factor clave en los procesos de muerte celular durante la desecación; y la adaptación directa a la desecación.

#### 4.- ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Definición</b>
<b>Wt</b>	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 silvestre
<b>Ad</b>	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 adaptada a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>WtD</b>	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 adaptada a Deseccación
<b>PGPR</b>	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
<b>WC</b>	Contenido de agua
<b>ROS</b>	Especies Reactivas de Oxígeno
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Aniones Superóxido
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrógeno
<b>OH<sup>·</sup></b>	Radical Hidroxilo
<b>ALE</b>	Evolución Adaptativa de Laboratorio
<b>LB</b>	Medio de Cultivo Sólido Luria Bertani
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias
<b>BSR</b>	Tasa de Supervivencia Bacteriana
<b>Cm</b>	Antibiótico Cloranfenicol
<b>SOD</b>	Enzimas Superóxido Dismutasa

## **5.- INTRODUCCIÓN**

### **5.1.- Problemas ambientales y alimentación**

Durante los últimos 50 años, los seres humanos han cambiado los ecosistemas a una mayor velocidad que en cualquier otro período comparable para satisfacer la creciente demandas de alimentos, agua dulce, madera, fibra y combustibles. Esto ha resultado en una pérdida sustancial irreversible de la diversidad de la vida sobre la Tierra.

El suelo es un recurso no renovable, por lo que su conservación es un factor crítico para garantizar las demandas crecientes de alimentos en el mundo (Vallejos *et. al.*, 2005). Algunos de los problemas relacionados con la creciente demanda alimenticia se deben principalmente a la degradación y pérdida de los suelos cultivables, así como a la pérdida del contenido de carbono orgánico, la disminución de la estabilidad estructural, la disminución de la actividad biológica del suelo, el aumento del riesgo de erosión y extensión de la salinización. Por otro lado el constante cambio climático representa un factor de estrés adicional al esfuerzo para la restauración de ecosistemas (Woodward *et. al.*, 2010).

### **5.2.- Inoculantes Microbianos**

Dado el aumento de la demanda de los productos derivados de la agricultura en los últimos años, los agricultores se han hecho cada vez más dependientes de los agroquímicos como una alternativa de protección de sus cultivos; sin embargo el uso continuo e indiscriminado de agroquímicos tiene un gran impacto en el medio ambiente, lo cual ha propiciado la búsqueda de alternativas sustentables y de menor impacto ambiental como lo son el uso de bacterias promotoras del crecimiento de plantas para la sustitución parcial o total de los agroquímicos.

Las plantas son desafiadas regularmente por una gran variedad de microorganismos patógenos presentes en su entorno. Sin embargo, las interacciones benéficas entre plantas y microorganismos también son frecuentes en la naturaleza y son conocidos por mejorar la nutrición de las plantas y/o ayudar a las plantas a superar las tensiones bióticas o abióticas. Por lo tanto, las plantas tienen que reconocer rápidamente la

interacción y activar una respuesta que le permita sobrevivir en el ambiente. Curiosamente, existe una creciente evidencia de que las plantas reaccionan de manera similar en la presencia tanto de los microbios patógenos como los no patógenos, en ambos casos son reconocidos por patrones moleculares que pueden o no desencadenar una respuesta inmune (Van Loon *et. al.*, 2008; Hermosa *et. al.*, 2012; Zamioudis and Pieterse, 2012). Sin embargo, con el fin de establecer una interacción beneficiosa que implica una colonización bacteriana eficiente, hay una necesidad de suprimir esa respuesta tras el reconocimiento del microorganismo (Gutjahr and Paszkowski, 2009; Zamioudis and Pieterse, 2012).

### **5.3.- Bacterias PGPB**

La inoculación de plantas con PGPB y simbioses de plantas tiene siglos de antigüedad. Cuando las poblaciones de rizobios nativa del suelo son insuficientes, es necesario la implementación de inoculantes comerciales a base de dichos microorganismos (Botha *et. al.*, 2004). La superficie de las raíces y las áreas circundantes del suelo (la rizosfera) constituyen un entorno donde los nutrientes liberados por la planta en forma de exudados están disponibles para los microorganismos (Birtles *et. al.*, 1997). En algunos casos, la efectividad de los inoculantes es baja debido a la competencia que se produce entre los rizobios introducidos y los microorganismos nativos (Bromfield *et. al.*, 1985). Los inoculantes son una formulación de microorganismos metabólicamente activos que compiten en el medio ambiente por el espacio y los nutrientes del suelo (Li and Alexander, 1988).

Además, los inoculantes microbianos deben superar problemas inherentes a su aplicación en los campos de cultivo tales como la pérdida de viabilidad durante el almacenamiento y manipulación en manos de los productores. La efectividad de un inoculante es a menudo la barrera más común para la comercialización de los mismos, la cual recae principalmente en el manejo de las cepas; es decir, son dos casos diferentes por un lado las pruebas de los inoculantes cuando se hacen bajo el cuidado de personal capacitado y condiciones de laboratorio precisas en las instalaciones de investigación el resultado puede ser el esperado, ahora bien que si la prueba de los inoculantes es hecha por agricultores los cuales carecen de conocimientos de

microbiología y en condiciones no controladas es evidente que el resultado sea muy alejado del que se obtuvo en un laboratorio (Stephens and Rask, 2000).

La primera condición, cuando se considera la inoculación de plantas con PGPB (incluyendo los rizobios), es encontrar la población bacteriana adecuada para el efecto previsto en el cultivo objetivo. A continuación se diseña una formulación específica del inoculante para el cultivo objetivo y un método de aplicación práctico, teniendo en cuenta las limitaciones de los agricultores (Bashan *et. al.*, 2014).

El uso de inoculantes microbianos para la mejora de la producción agrícola sostenible se está convirtiendo en una práctica cada vez más aceptada en la agricultura intensiva en muchas partes del mundo. Las PGPB son bacterias de vida libre de suelo que colonizan las raíces, generando una relación rizosfera-planta mejorando el crecimiento y rendimiento de las plantas cuando se aplican ya sea a las semillas o directamente en los cultivos (Kumar *et. al.*, 2014).

El efecto de las PGPR en el crecimiento de las plantas se explica principalmente por la liberación de metabolitos que estimulan directamente el crecimiento. Varios mecanismos se han postulado para explicar cómo las PGPR benefician la planta huésped. Estos incluyen: la capacidad de producir los reguladores de crecimiento de plantas o fitohormonas como el ácido indol acético (AIA), citoquininas, giberelinas (Glick, 1995; Marques *et. al.*, 2010) además de mejorar la fijación de N<sub>2</sub>, (Sahin *et. al.*, 2004, Khan, 2005) solubilizan el fosfato inorgánico y la mineralizan el fosfato orgánico y/u otros nutrientes (Glick, 1995; Jeon *et. al.*, 2003) producción de sideróforos, inclusive promueven un efecto antagonista contra microorganismos fitopatógenos mediante la síntesis de antibióticos, enzimas, y/o compuestos fungicidas (Dey *et. al.*, 2004; Lucy *et. al.*, 2004).

El reciente interés en las rizobacterias y su impacto en los beneficiosos que se obtienen al probarlos en los cultivos ha ido aumentando en los últimos años, ya que en diversos estudios se ha demostrado los efectos sobre el crecimiento y el rendimiento de diferentes cultivos, en diferentes ambientes en condiciones ecológicas variables (Ozturk *et. al.*, 2003; Marques *et. al.*, 2010; Mehnaz *et. al.*, 2010; Zhang *et. al.*, 2012). Los

beneficios en plantas debido a la adición de PGPR incluyen aumentos en las tasas de germinación, crecimiento de la raíz, mayor producción de grano, área foliar, contenido de clorofila, contenido de magnesio, contenido de nitrógeno, contenido de proteína, actividad hidráulica, tolerancia a la sequía, aumento de peso de la raíz y senescencia foliar tardía. Otra ventaja importante del uso de las PGPR es la resistencia a enfermedades que le confieren a las plantas, conocido como "control biológico" (Mishustin and Naumova, 1962). Sin embargo el suelo es un entorno impredecible y existe la posibilidad de un resultado no contemplado (Bashan, 1998). En un estudio realizado por Frommel *et. al.*, (1993), la mala colonización del PGPR en raíces de las plantas se produjo debido a las condiciones adversas, incluyendo la grave infección por *Verticillium* del suelo, bajo pH del suelo, alta temperatura y la escasez de precipitaciones durante la temporada de crecimiento. Estas condiciones de crecimiento adversas contribuyeron probablemente a la baja colonización de la raíz (Dobbelaere *et. al.*, 2001; Klein *et. al.*, 1990; Parke, 1991; Suslow and Schroth, 1982). La variabilidad climática también tiene un gran impacto en la efectividad de las PGPR (Okon and Labandera-González, 1994), pero a veces las condiciones de crecimiento desfavorables en el campo son de esperar como un funcionamiento normal de la agricultura.

Diferentes tipos de suelo pueden influir en la eficacia de PGPR (Kloepper *et. al.*, 1980), en un estudio con trigo y *Pseudomonas*, los resultados sugirieron que a menor fertilidad del suelo, mayor es la estimulación del crecimiento de plantas por la PGPR (De Freitas and Germida, 1990). Esto es similar a lo observado en los estudios realizados con especies de *Azospirillum*, a pesar del hecho de que *Pseudomonas* fijan poco o nada de nitrógeno. Por otro lado, la promoción del crecimiento del maíz con una cepa de *Azospirillum lipoferum* ha informado estar ligado al tipo de suelo en el campo (Fages, 1994). Al elegir un PGPR eficaz para una planta en un sitio específico, es imprescindible tener en cuenta el nivel de nutrientes en el suelo y cómo el PGPR podría influir en el lugar.

Por otro lado en el campo, el número de PGPR aplicadas a la planta a menudo es vital para promover el crecimiento adecuado (Boddey and Dobereiner, 1988), grandes cantidades de bacterias podría ser perjudicial para la germinación y crecimiento de las

semillas o plantas (Chanway, 1997). Varios estudios demuestran que los efectos de estimulación del crecimiento se ven en el desarrollo temprano de la planta, y éstos posteriormente se traducen en rendimientos más altos (Glick *et. al.*, 1997; Hoffmann-Hergarten *et. al.*, 1998; Kloepper *et. al.*, 1988; Polyanskaya *et. al.*, 2000).

#### **5.4.- *Pseudomonas putida* KT2440**

Actualmente la clasificación para los miembros del género *Pseudomonas*, está basada en la homología de secuencias de RNA, donde el género *Pseudomonas* se ubica taxonómicamente en el dominio Procariota, orden Pseudomonadales, familia Pseudomonadaceae y está conformada por cinco grupos, donde se incluye el grupo fluorescente (Grupo I ARNr), constituido a su vez por las especies: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas veronii* y *Pseudomonas monteilii* (Martínez, 2001).

El género *Pseudomonas* es un género muy amplio, con un gran número de especies, y todas comparten una amplia variabilidad metabólica, fisiológica y genética que hace posible que colonicen con éxito una gran variedad de nichos. Las bacterias de este grupo participan en muchas actividades de importancia biotecnológica, medioambiental y biosanitaria; como el reciclaje de elementos, la interacción y protección frente a patógenos en las raíces de plantas, la síntesis de polímeros de interés, la degradación de compuestos orgánicos de todo tipo, tanto xenobióticos como biogénicos o la producción de enfermedades tanto en animales como en plantas (Timmis, 2002). Bacterias como *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* han sido identificadas por poseer actividades promotoras de crecimiento, adicionalmente poseen tiempos cortos de generación, alta movilidad, fijación biológica de nitrógeno, capacidad para colonizar las raíces y producción de metabolitos secundarios que pueden regular el crecimiento vegetal y regular las poblaciones microbianas de la rizosfera (Kapulnik, 2002).

*Pseudomonas putida* es una bacteria Gram negativa adaptada a vivir en ambientes muy diversos, tanto aerobios como microaerobios, y como ya se ha mencionado con anterioridad poseen un metabolismo muy versátil y puede utilizar gran variedad de

compuestos como fuente de carbono. La expresión de los genes implicados en el transporte y metabolismo de estas fuentes de carbono está controlada por diversos sistemas de regulación global que optimizan el metabolismo en cada situación. Es importante entender el funcionamiento de estas redes de regulación, las señales a las que responden y los mecanismos moleculares por los que operan, para saber cómo se adaptan las bacterias a su medio ambiente, cómo se asimilan las diversas fuentes de carbono y energía, además de cómo se coordinan y modifican los programas de transcripción de forma que la bacteria pueda competir y sobrevivir en su ecosistema (Rojo *et. al.* 2008).

*P. putida* se ha convertido en el paradigma de bacteria del suelo metabólicamente cambiante capaz de degradar una amplia variedad de contaminantes orgánicos en compartimentos aeróbicos del medio ambiente, particularmente hidrocarburos aromáticos y alifáticos, ejerciendo por tanto un papel clave en el mantenimiento de la calidad del ambiente. Con frecuencia aparece como el organismo predominante en cultivos de enriquecimiento en los que se utiliza un compuesto recalcitrante como única fuente de carbono y energía, probablemente debido a que las condiciones usualmente utilizadas en estos enriquecimientos (alta aireación, disponibilidad de minerales, temperatura de incubación de entre 20 y 30 °C, etc.) favorecen su rápido crecimiento (Williams and Murray, 1974).

Dado que *P. putida* no es patógena de animales o vegetales, hace que estas especies saprófitas sean consideradas ambientalmente y buena candidata para desarrollar linajes seguros para experimentos con DNA, además constituye una excelente herramienta de laboratorio para investigar las bacterias de suelo y los procesos en los que están implicadas (Timmis, 2002). La cepa KT2440 de *P. putida* deriva de *Pseudomonas arvilla* mt-2, la bacteria degradadora de tolueno mejor caracterizada y que fue posteriormente reclasificada como *P. putida* mt-2 (Bagdasarian *et. al.*, 1981) (Williams and Murray, 1974). *P. putida* KT2440 está siendo utilizado como un organismo modelo en estudios de interacción planta-microbio para establecer las bases moleculares de la adhesión de semilla inicial y posterior colonización de la raíz (Nakazawa, 2002), además de su potencial para la eliminación de xenobióticos, exhibe

alta aptitud en la colonización de la rizósfera de un gran número de plantas como maíz, trigo, fresa, caña de azúcar y espinaca (Molina *et. al.* 2000); también ha sido usada para desarrollar nuevos biopesticidas y promotores del crecimiento de plantas que funcionan en la rizósfera de plantas (Espinosa-Urgel *et. al.*, 2002).

El establecimiento de *P. putida* en raíces de las plantas aparece como un proceso muy rápido y dinámico en el que tres etapas pueden ser definidas:

- 1) Una “fase de atracción” de movimiento bacteriano probablemente como resultado de las respuestas quimiotácticas a la presencia de la raíz.
- 2) Una rápida “etapa de arreglo”, en el que las bacterias crecen, se dividen y se agregan para formar microcolonias alrededor de la raíz.
- 3) Una “fase de residencia”, donde la población establecida alcanza el tamaño máximo relativo a la raíz, de manera que los números de bacterias está ligado al peso raíz y permanecen constantes (Espinosa-Urgel *et. al.*, 2002).

## **5.5.- Deseccación**

El secado extremo hasta el equilibrio con aire, es letal para la mayoría de las especies de animales y plantas. Debido a que no existen cultivos tolerantes a la desecación la sequía sigue siendo una de las principales causas en la pérdida de cultivos, y uno de los factores ecológicos con mayor impacto en la agricultura.

La definición de la desecación es el secado a  $<0.1\text{g H}_2\text{Og}^{-1}$  masa seca (10% de contenido de agua [WC]) o menos. Esto es aproximadamente equivalente a sequedad aire a 50% de humedad relativa a 20°C y corresponde a un potencial de agua de aproximadamente -100 MPa (Gaff, 1989; Haranczyk *et. al.*, 1998; Proctor, 2003).

Desde una perspectiva biológica el umbral de 10% WC, corresponde al punto en el agua es insuficiente para la formación de una monocapa alrededor de macromoléculas, interrumpiendo las reacciones enzimáticas y por lo tanto el metabolismo (Billi and Potts, 2002). Por lo tanto la tolerancia a la desecación se define como la capacidad de secar al equilibrio con el aire que es de moderada a extremadamente seco y posteriormente

recuperar la función normal después de la rehidratación, se considera como un mecanismo desarrollado para tolerar la sequía. La sequía suele estar asociada a calor o frío, luego entonces la tolerancia a la desecación podría no permitir a los organismos sobrevivir a la sequía si son sensibles a las temperaturas extremas (Alpert, 2002; Hoekstra, 2005).

Una importante diferencia funcional entre la desecación completa y parcial es que la desecación completa parece siempre estar acompañada por el cese del metabolismo medible, mientras que la desecación parcial a menudo se centra en el estudio del metabolismo de mantenimiento (Danks, 2000).

Por otro lado se sabe que el oxígeno es un compuesto vital para organismos aerobios, pero en exceso, este compuesto puede tener efectos muy perjudiciales al formar radicales libres siendo éstos uno de los principales causantes de daño oxidativo durante la desecación. El estrés hídrico aumenta la formación ROS que resulta en la peroxidación de lípidos, daño a proteínas y ácidos nucleicos con graves consecuencias sobre el metabolismo general (Hansen *et. al.*, 2006), incluso la oxidación de proteínas se ha propuesto como un factor causal en muchas enfermedades (Ames *et. al.*, 1993).

Durante el secado, la activación de los diferentes mecanismos de protección parece actuar en diferentes etapas de la pérdida de agua. La estrategia de supervivencia durante la deshidratación temprana se considera que evita alteraciones de proteínas de membrana y despliegue (Bewley, 1973; Crowe *et. al.*, 1992). Existe una probabilidad de que no todas estas defensas se han activadas en todo momento; posiblemente los organismos han desarrollado una combinación definida de estos mecanismos cuando están en necesidad de protección (França *et. al.*, 2007).

Los organismos aeróbicos utilizan el oxígeno como aceptor de electrones; sin embargo, durante la respiración el oxígeno se puede reducir parcialmente formando ROS, tales como los  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  y el  $OH^-$ . Las investigaciones sugieren que las mitocondrias convierten 1-2 % del oxígeno consumido en  $O_2^-$  (Boveris and Chance, 1973). Estas especies pueden causar estrés celular significativo y daños; el equilibrio entre la producción de ROS y defensas celulares determina el grado de estrés oxidativo.

## 5.6.- Evolución Adaptativa

Es un método para optimizar ciertas características de las cepas bacterianas empleadas en la industria (por ejemplo, tolerancia a ciertos inhibidores, la utilización de sustratos, la temperatura de crecimiento) sin necesidad de conocimientos de cualquier mecanismo genético subyacente, siempre que el rasgo deseado se puede acoplar con el crecimiento. Es decir, implica simplemente la resistencia de una cepa microbiana, por lo general de cientos de generaciones bajo la influencia de la presión selectiva deseada. Las cepas mejoradas se obtienen mediante el aislamiento repetido o subcultivo, caracterización y secuenciación de estas cepas mutantes.

A pesar de la simplicidad de la evolución adaptativa de laboratorio, hay muchos factores que interfieren en los resultados de experimentos de evolución. Factores tales como el tamaño de la población, tasa de mutación, la frecuencia de mutaciones beneficiosas que determinan la estructura de la población durante la evolución; pueden resultar en estructuras de población complejas derivadas de la interferencia clonal, se genera un efecto en el que los mutantes compiten dentro de una población. Inclusive la pérdida de linajes de la población; depende del momento en el que los mutantes se aíslan de la población. Por consiguiente si el objetivo final de la evolución adaptativa radica en la identificación de la base genotípica de un rasgo en particular, entonces la pérdida de linajes en una población impone un límite en los mecanismos de adaptación. La tasa de mutación se puede mejorar a través de mutagénesis de células al azar, aumentando así la diversidad genética de las poblaciones en evolución de modo que la adaptación puede proceder más rápidamente. Otras variables importantes incluyen la fuerza de la presión selectiva, el tamaño de la población, y la longitud del experimento, todos los cuales, en combinación, influyen en el resultado de la evolución (Winkler *et. al.*, 2013).

## 6.- ANTECEDENTES

Desde el descubrimiento de los rizobios en 1886 (Hellriegel, 1886) y durante unos 120 años, los inoculantes de *Rhizobium* se han producido comercialmente en todo el mundo, principalmente en los países desarrollados (Cartroux *et. al.*, 2001; Deaker *et. al.*, 2004).

Los estudios realizados en la Unión Soviética sugieren que los mejores resultados se obtienen cuando la humedad del suelo es de 40% (Marrón, 1974; Cooper, 1959), por lo que el contenido de humedad del suelo afecta a la colonización de la rizosfera de plantas por las PGPR después de la inoculación (Burr *et. al.*, 1978).

Kloepper *et al.* (1980) encontraron que de cada cuatro cepas de *Pseudomonas* que promovieron el crecimiento de rábano, sólo uno era eficaz en la promoción del crecimiento de la patata. También se ha observado que máximos incrementos en la germinación y el rendimiento a menudo se producen en los cultivos inoculados con PGPR de cepas aisladas de la rizósfera de la misma planta (Fages and Arsac, 1991). A pesar de extensos estudios sobre *P. putida*. KT2440, la respuesta de la planta a *P. putida*. KT2440 y la colonización no se ha investigado todavía. En el estudio de Planchamp *et. al.* (2015), las plantas de maíz fueron inoculadas con *P. putida*. KT2440 y la respuesta de la planta a esta interacción rizobacteria-planta se investigó en los niveles de transcripción y metabolómica. Se encontró que *P. putida*. KT2440 provocó una respuesta planta huésped que podría beneficiar a la colonización rizobacteriana, además se encontró un patrón de colonización de las raíces y se confirmó la eficacia de *P. putida*. KT2440 para colonizar las raíces de maíz var. Golden Jubilee y su fluctuación durante el crecimiento de las plantas antes de llegar a una colonización estable.

David Keilin introdujo por primera vez el anabiosis plazo (también conocido como criptobiosis, "vida oculta") para describir el estado inusual de la organización biológica donde las células dejan de metabolizar, pero se mantienen viables en un estado de "animación suspendida" (Clegg, 2001).

En 1985, H. Sies propuso el concepto de «estrés oxidativo» como un desbalance, en el que hay un aumento de oxidantes o una disminución de antioxidantes, en comparación con la situación definida como normal (Sies H., 1985). El concepto está inspirado en la idea de estrés de H. Selye instalada para el síndrome general de adaptación fisiológica, y en la idea de Gerschman que tanto la hiperoxia como la disminución de antioxidantes llevan a daño tisular (Boveris A., 2005).

Aldsworth *et. al.* (1999) han propuesto incluso que las células bacterianas perciben tensiones todas como un estrés oxidativo. La hipótesis de la respuesta de suicidio propone que el crecimiento de las bacterias de crecimiento activo y que respiran aeróbicamente es detenido en respuesta al estrés, pero el metabolismo persiste por algún tiempo. El desacoplamiento del crecimiento y el metabolismo genera radicales libres que pueden resultar letal para la célula.

La evolución adaptativa de laboratorio (ALE) como un enfoque científico es muy importante para el análisis de los fenómenos evolutivos en un entorno de laboratorio controlado. Los principios en que se basan los experimentos de evolución de laboratorio, se remontan a los científicos como Anton van Leeuwenhoek, Louis Pasteur, Robert Koch y sobre todo Charles Darwin, con sus descubrimientos de los microorganismos, la aceptación general de la teoría de los gérmenes y la importancia de los recursos naturales y la selección artificial de la evolución biológica y la cría (Bennett *et. al.*, 2009).

Durante ALE microbiana, un microorganismo se cultiva en condiciones claramente definidas por períodos prolongados de tiempo, del orden de semanas a años, lo que permite la selección de fenotipos mejorados (Hardison, 2003). Permite cambios fenotípicos a estar claramente asociados con un entorno de crecimiento determinado que conduce a la selección de rasgos (Sचना *et. al.*, 1995).

Estudios han sido enfocados para generar bacterias tolerantes a desecación a través de la adaptación a otras sustancias, como es el caso de un trabajo hecho con la adición de trehalosa o sacarosa exógena a las células que son sensibles al secado es posible aumentar su capacidad de supervivencia (Leslie, 1995; de Castro, 2000); se ha

observado que estos azúcares también entran en las células durante el enfriamiento. La ingeniería de la síntesis de sacarosa en *E. coli in vivo* condujo a un aumento de 10 veces (Crowe *et. al.*, 1992) en la supervivencia de las células ya sea después de la desecación o secado por congelación y luego rehidratación (Billi *et. al.*, 2000).

La tolerancia a la desecación se puede inducir en bacterias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* y *Bradyrhizobium japonicum* mediante la adición de trehalosa o hidroxietoína en el medio de cultivo (de Castro *et. al.*, 2000; Tunnacliffe *et. al.*, 2001; Manzanera *et. al.*, 2002, 2004, Streeter, 2003).

En 1954, Rebeca Gerschman trabajando en la Universidad de Rochester, publicó en Science un artículo imaginativo y trascendente “Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common”, la “teoría de Gerschman” como fue conocida en su momento postulaba que: (a) los radicales libres del oxígeno son el mecanismo común de las toxicidades del oxígeno y de la radiación; (b) un aumento en la presión parcial de oxígeno o una disminución de la defensa antioxidante llevan igualmente al daño celular y tisular; y (c) la toxicidad del oxígeno es un fenómeno continuo (Boveris, 2005).

El “dogma de Fridovich” (Fridovich, 1975) donde las enzimas SOD y catalasa constituyen la defensa antioxidante principal de las células aerobias contra la toxicidad del oxígeno. Las dos enzimas poseen un efecto sinérgico al eliminar al  $O_2^-$  y al  $H_2O_2$  de los sistemas biológicos. El mecanismo molecular por el cual ambos productos de la reducción parcial del oxígeno ejercen su toxicidad biológica se explicó (a) tomando reacciones descritas por Fenton (1890) y Haber y Weiss (1934) donde el  $O_2^-$  y el  $H_2O_2$  reducen y oxidan al hierro (Fe), omnipresente en los sistemas biológicos, con generación de radical  $OH^\cdot$ , como producto de la escisión hemolítica del  $H_2O_2$ , y (b) considerando la altísima reactividad química del  $OH^\cdot$  que hace una abstracción de hidrógeno, una oxidación, en cualquier colisión molecular con una biomolécula. Los tres intermediarios de la reducción parcial del oxígeno ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  y  $OH^\cdot$ ) pasaron a ser denominados conjuntamente “ROS” a favor de efectos biológicos semejantes y aunados por el camino químico de Fenton/Haber-Weiss. El concepto de ROS se pierde en la identificación química de las moléculas involucradas pero le impartió una operatividad biológica, médica y clínica extraordinaria, la que favoreció el

establecimiento del campo de la biología de los radicales libres oxidativos. (Boveris, 2005).

Estudios recientes han demostrado que en *Anabaena* PCC 7120 cuando le es adicionado a su medio de crecimiento NaCl, genera una respuesta de activación de la proteína *KatG* que a su vez desintoxica los niveles elevados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; disminuyendo o evitando daños mediada por ROS causado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Demostrando la capacidad de un compuesto sencillo (NaCl) para modular la resistencia global del estrés oxidativo (Chakravarty *et. al.*, 2015).

## **7.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La creciente demanda de alimentación de la población mundial ha promovido la intensificación de los sistemas agrícolas. Para aumentar la productividad y rendimientos de los cultivos se ha recurrido a uso excesivo e indiscriminado de fertilizantes y pesticidas impactando negativamente los suelos, mantos acuíferos y el clima. La baja productividad de las tierras de cultivo y los impredecibles cambios climáticos, han propiciado la búsqueda de estrategias agrícolas sustentables como lo son el uso de inoculantes microbianos a base de bacterias del tipo PGPR. La sequía sigue siendo uno de los principales retos de la agricultura y del uso de bacterias benéficas, por lo que el mejoramiento en el rendimiento de las plantas de cultivos con el uso de inoculantes con PGPR dependerá principalmente de la resistencia de dichas bacterias a la desecación.

El propósito del proyecto pretende la obtención y el desarrollo de un fenotipo tolerante a desecación de una bacteria promotora de crecimiento en plantas como *Pseudomonas putida* KT2440 mediante la técnica de evolución adaptativa, para estudiar sus mecanismos de tolerancia.

## **8.- JUSTIFICACIÓN**

Las condiciones climáticas de diversas zonas de cultivo tienden a ser de temperaturas muy elevadas y con poca humedad causando pérdidas en las propiedades de las tierras de cultivo. El uso de inoculantes con bacterias tipo PGPR en estas zonas es poco efectivo debido a la baja supervivencia de las bacterias ante la desecación; por

consiguiente es de gran importancia la elaboración de inoculantes que si bien promueven el crecimiento de las plantas, también sean capaces de mantener su efectividad y resistir a factores de estrés como la desecación.

## 9.- HIPÓTESIS

Las vías de respuesta de un organismo al estrés se asocian con un aumento en la actividad enzimática y la mutagénesis, que constituyen un mecanismo avanzado para elevar transitoriamente la tasa de supervivencia de una población ante una situación adversa. Por consiguiente el estrés inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y/o la exposición continua a desecación aumentará directamente la capacidad de *Pseudomonas putida* KT2440 de tolerar estrés oxidativo y como éste el principal factor de muerte celular durante la desecación, la bacteria también será tolerante a la desecación.

## 10.- OBJETIVOS

### -Objetivo General

- Desarrollar un fenotipo de *Pseudomonas putida* KT2440 resistente a desecación a partir de la adaptación a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la propia desecación.

### -Objetivos Particulares

- Obtener una cepa de *Pseudomonas putida* KT2440 tolerante a desecación a través de la administración creciente de concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el medio de crecimiento.
- Realizar caracterización del fenotipo adaptado a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Hacer curvas de crecimiento para comparar la *P. putida* KT2440 Wt y *P. putida* KT2440 Ad.
- Obtener una cepa de *Pseudomonas putida* KT2440 tolerante a desecación a través de la exposición constante a desecación.
- Realizar caracterización del fenotipo adaptado a Desecación.

## 11.- MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación de Medio de Cultivo Sólido

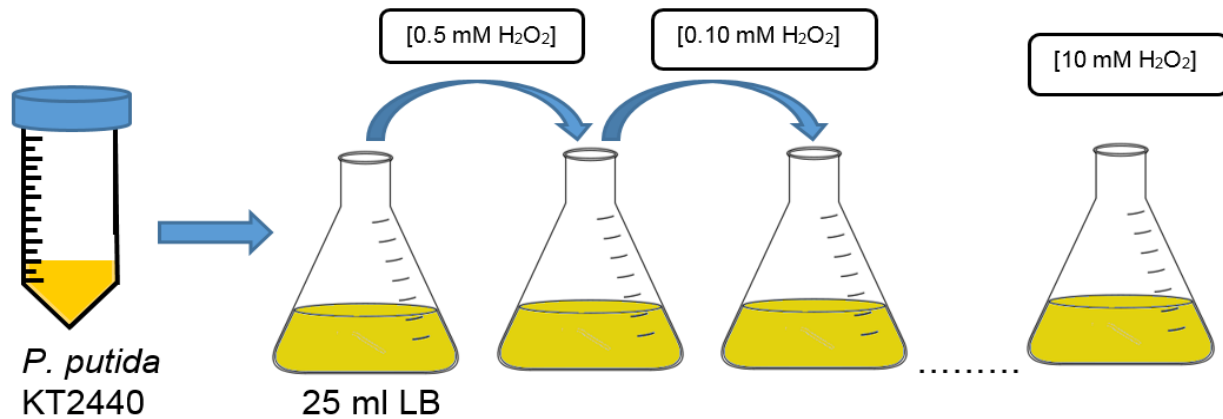
LURIA BERTANI	1000 ml
Peptona de Caseína	10 gr
NaCl	10 gr
Extracto de Levadura	5 gr
Agar Bacteriológico	16 gr

### Adaptación a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

La bacteria de estudio que se empleó fue *Pseudomonas putida* cepa KT2440 que fue donada por el Dr. Jesús Muñoz Rojas del grupo de Ecología Molecular Microbiana del Instituto de Ciencias de la BUAP. La bacteria se inoculó en una placa Petri con medio de cultivo sólido LB adicionado con el antibiótico Cm (100 mg/ml) para evitar la contaminación con otras bacterias, la placa se dejó en el cuarto de incubación a una temperatura de 30°C durante 24 horas para su crecimiento.

Para la generación de tolerantes a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se aplicó la técnica de evolución adaptativa de laboratorio (ALE) que por sub-cultivo permite la generación de cambios fenotípicos en una población de microorganismos, está directamente relacionada con la selección de rasgos que son determinados por el entorno de crecimiento (Schena *et. al.*, 1995) (Figura1). Por lo tanto pasadas las 24 horas y en campana de flujo laminar se tomó una muestra de células de la placa mediante un asa bacteriológica y se inoculó en dos matraces con un volumen de trabajo de 25 ml de medio de cultivo líquido LB y Cm (100 mg/ml); los matraces se rotularon como control y M1 este último se le agregó una concentración de 0.05mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, los cultivos se dejaron en una incubadora orbital durante 24 horas a una temperatura de 30°C y con agitación continua rotatoria a 200

rpm. El crecimiento de cultivos experimentales se monitoreó mediante la medición de la densidad óptica (O.D.) a 600<sub>nm</sub> utilizando un espectrofotómetro Buck Scientific (modelo Vis 100).



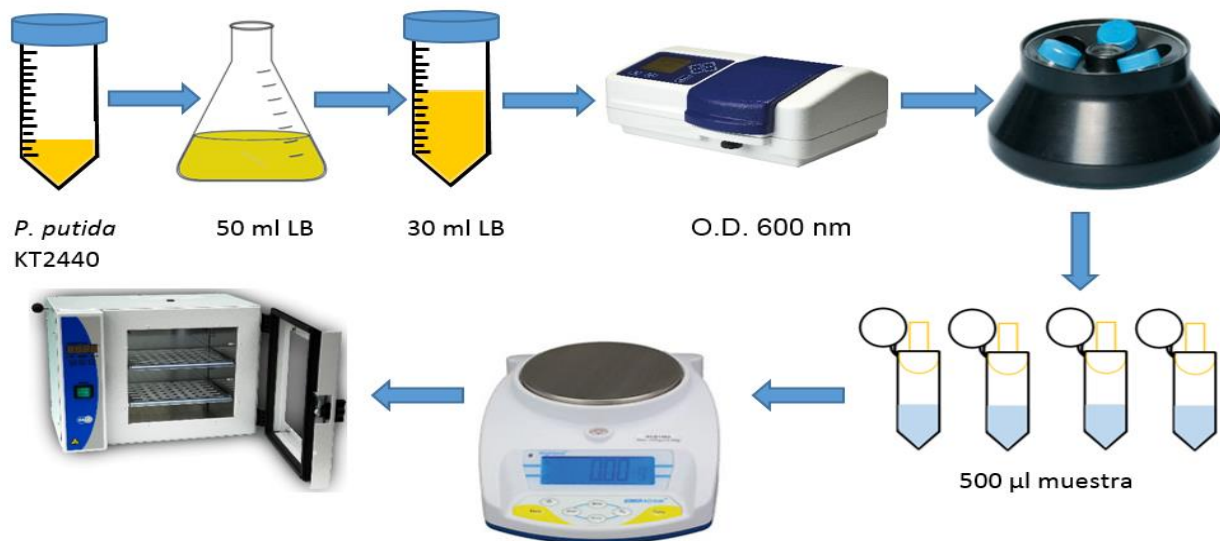
**Figura 1.** Técnica de Evolución Adaptativa de Laboratorio (ALE).

### Desecación

Después del proceso de adaptación de *P. putida* KT2440 a  $H_2O_2$  se llevó a cabo la prueba de tolerancia a desecación por un periodo de 33 días, comparando la supervivencia de *P. putida* KT2440 Wt y la Ad. Para ello se inocularon dos tubos falcon de 50 ml conteniendo un volumen de 10 ml de medio LB y Cm (100 mg/ml) con la cepa Wt y la Ad. Se mantuvieron en una incubadora orbital durante 24 horas a 30 °C a una velocidad de agitación de 170 rpm. Pasadas las 24 horas se lavaron las células tres veces, para ello se centrifugaron las muestras de cultivo durante 10 minutos a 14,000 rpm, se decantó el sobrenadante y se re-suspendieron las células en el mismo volumen de agua destilada estéril.

Posteriormente se homogenizaron las muestras con un vórtex, y se colocaron 500  $\mu$ l de cada suspensión bacteriana en tubos eppendorf de 1.5 ml, a continuación cada tubo eppendorf se rotuló y se le colocó un tapón de algodón para permitir la entrada de aire y evaporación del agua, por último se obtuvo el peso inicial de los tubos y se colocaron dentro de una incubadora estufa de cultivo ECOSHEL (modelo 9082) a una temperatura de 30°C y una humedad relativa del 50% (Figura 2); el experimento se repitió usando

una cámara de crecimiento de plantas (modelo WGC-1000) controlando la humedad en 50% y temperatura en 30 °C. La cuantificación y registro del número de células durante todo el proceso de desecación se realizaron los días 0, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 33. Se hicieron cinco repeticiones de cada tiempo monitoreado. Después de 5 días, el agua de cada tubo se había evaporado totalmente, para poder cuantificar el número de bacterias las células se re-suspendieron con el volumen inicial de agua destilada estéril permitiendo su rehidratación durante aproximadamente veinte minutos. Después de rehidratar, la cantidad de UFC/ml se determinó sembrando las bacterias en placas con medio de cultivo LB complementado con Cm y se emplearon dos técnicas para el monitoreo de colonias: la técnica de Goteo por Sellado en Placa Masivo (Corral-Lugo *et al.*, 2012) y de Extendido en placa (Spread plate) (Cormier and Janes, 2014). Después de incubar las placas por 24 horas se contaron las colonias y se calculó la BSR. Los datos se analizaron y graficaron a través del programa de computación Excel.

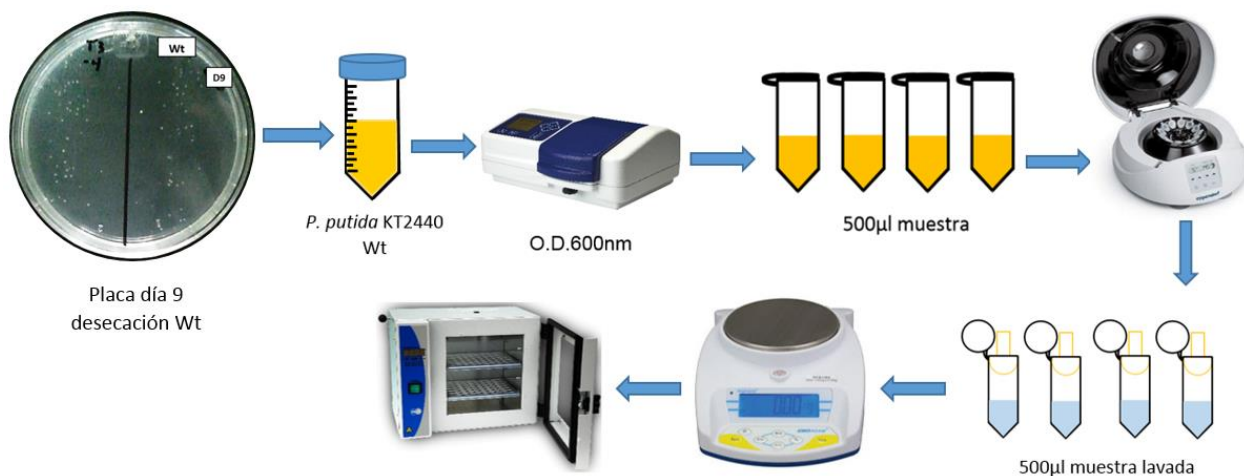


**Figura 2.** Diseño experimental para evaluar y comparar la supervivencia de *P. putida* KT2440 Wt y Ad.

### Adaptación de *P. putida* KT2440 a Desección

*P. putida* KT2440 Wt fue sometida a desecación por nueve días, después de ello las bacterias se re-suspendieron en agua por 30 min y se sembraron en placas Petri. A

partir de las poblaciones bacterianas del día 9, mediante un asa bacteriológica se tomaron las colonias, se suspendieron en 10 ml de medio LB y se incubó a 30°C durante 24 h con agitación continua a 200 rpm. Pasadas las 24 horas se hizo un lavado de las bacterias, se re-suspendieron en agua destilada estéril y se sometieron a un nuevo ciclo de desecación por 9 días. El proceso se repitió hasta obtener un fenotipo resistente a desecación (Figura 3). La cuantificación y registro del número de colonias durante el proceso de desecación se realizaron los días 0, 3, 6, 9, posteriormente aumentando el monitoreo hasta el día 18; con tres repeticiones por cada monitoreo (Muñoz Arenas *et. al.*, 2006).



**Figura 3.** Procedimiento de adaptación a desecación de *Pseudomonas putida* KT2440.

El análisis de las tasas de supervivencia, se realizó con el programa Excel a través de la siguiente fórmula de BSR:

D. D. (Después de Desecación).  
 A. D. (Antes de Desecación).

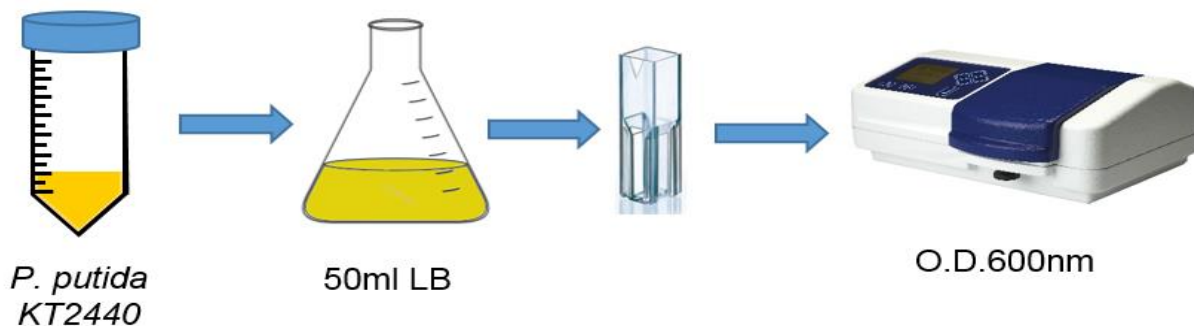
$$BSR = \frac{\text{Log} \left[ \left\{ \frac{\text{UFC}}{\text{ml}} \text{ D.D.} \right\} + 1 \right]}{\text{Log} \left[ \frac{\text{UFC}}{\text{ml}} \text{ A.D.} \right]} \times 100$$

## Curva de Crecimiento

Para llevar a cabo la curva de crecimiento de la *P. putida* KT2440 Wt y la Ad, previamente al experimento, se hicieron pre inóculos en tubos falcon con 10 ml de LB y 10  $\mu$ l de Cm que se incubaron durante 24 horas a 30 °C y agitación de 200 rpm; pasadas las 24 horas se midió la densidad óptica del pre inóculo, se ajustó a 0.1 O.D.<sub>600nm</sub> y se colocó en 2 matraces con 100 ml de LB estéril adicionados con 100  $\mu$ l Cm para la Wt y 2 matraces para la Ad.

Después de inocular los matraces se midió la densidad óptica del tiempo cero y se repitió las mediciones cada hora hasta las 11 horas (Figura 4). Para el registro de la curva de crecimiento se utilizaron placas Petri con medio LB adicionado con Cm, se emplearon dos técnicas Goteo por Sellado en Placa Masivo y Extendido en Placa el monitoreo se realizó las primeras 4 horas posteriormente se hizo cada 2 horas.

Luego de haber hecho la curva de crecimiento en LB sin ningún estresor se realizó una curva de crecimiento en el que al medio de cultivo le fue agregado 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; se llevó a cabo la misma metodología que la curva de crecimiento anterior. Las placas de LB con los dos experimentos se rotularon y se dejaron en el cuarto de incubación durante 24 horas a 30°C, los datos obtenidos de las UFC/ml se analizaron y graficaron a través del programa Excel.

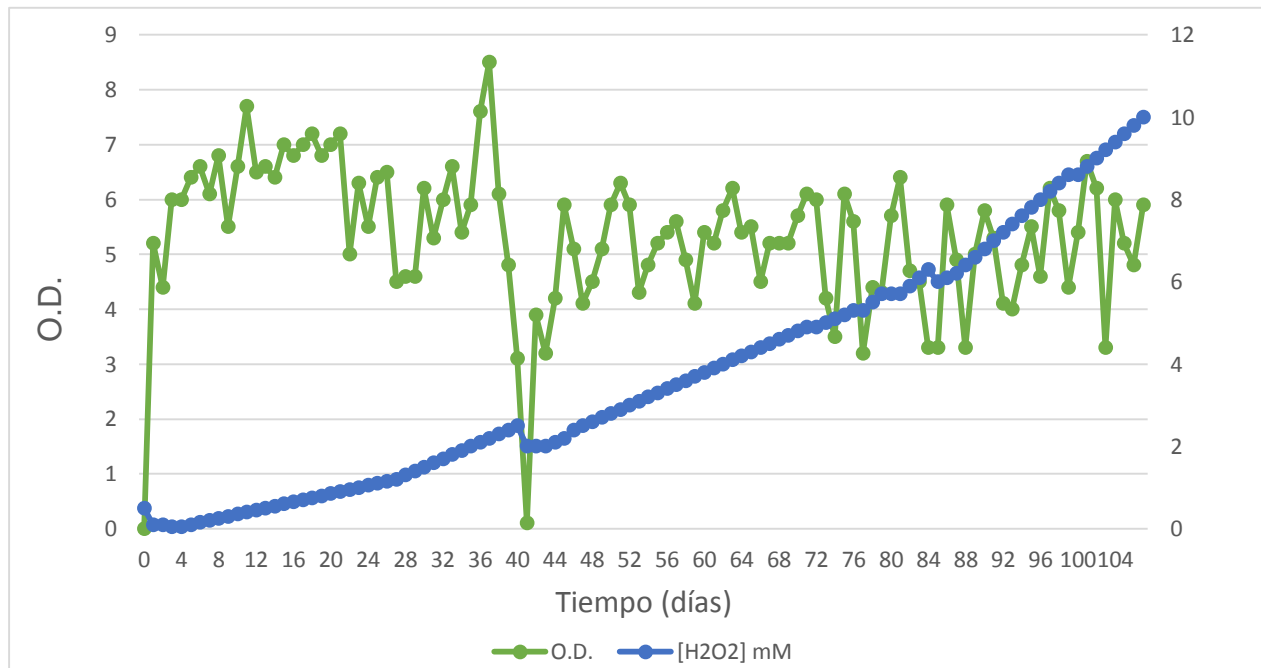


**Figura 4.** Método del experimento de Curva de Crecimiento.

## 12.- Resultados

### Adaptación a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

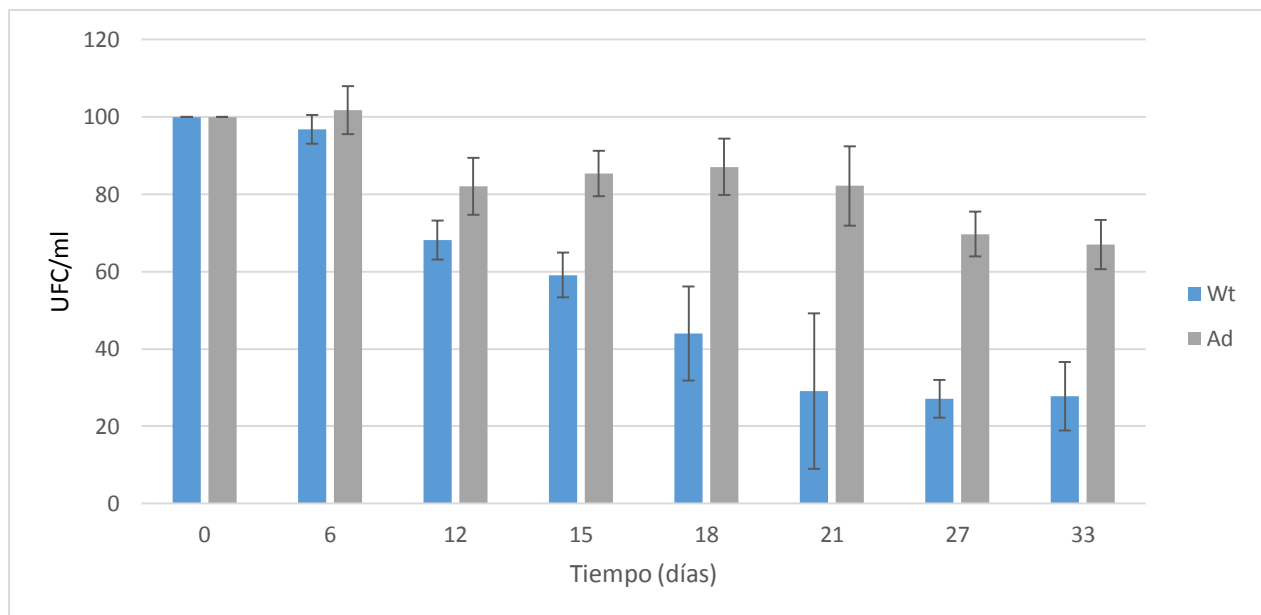
El proceso de adaptación de *P. putida* KT2440 a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se realizó en un periodo de 6 meses. Se observó que el aumento en las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cada ciclo de adaptación debe ser mínimo de lo contrario puede repercutir en el crecimiento de la población. No obstante después de sub-cultivar diariamente durante 6 meses se logró llegar a la concentración de 10 mM y la población no se vio afectada y creció en esas condiciones, por lo que se puede decir que la metodología aplicada para la adaptación de esta bacteria fue efectiva e inclusive el éxito del experimento se corroboró sometiendo la Ad a desecación y comparada con la Wt (Figura 5).



**Figura 5.** Adaptación de *P. putida* KT2440 a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, donde se observa el aumento constante de la concentración simultáneamente con la variación de los valores de densidad óptica del cultivo.

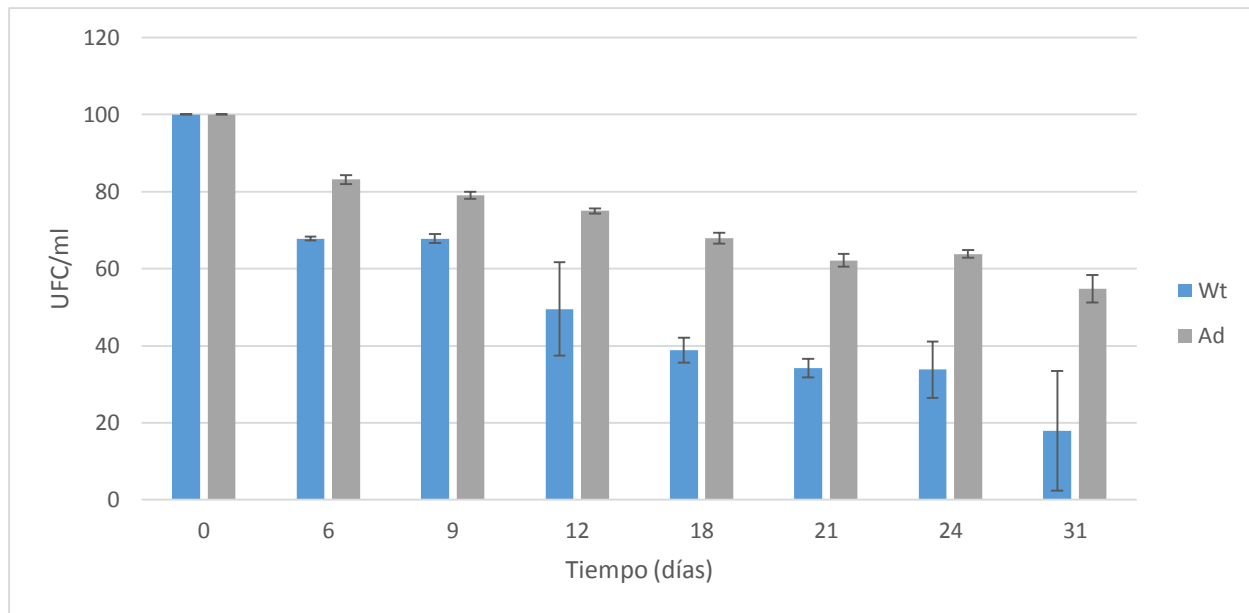
### Experimento de Deseccación

Durante el experimento hecho en la cámara de cultivo vegetal, donde se comparó la supervivencia de *P. putida* KT2440 Wt y *P. putida* KT2440 Ad a 10mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tuvo como resultado la presencia de UFC de las dos muestras hasta el último día del experimento; no obstante la Ad mostró en todo momento una tasa de supervivencia mayor a la Wt (Figura 6).



**Figura 6.** Supervivencia a desecación de *P. putida* KT2440 Wt y Ad en la cámara de crecimiento de plantas. Se observa la resistencia de la Ad y la constante disminución de UFC de la Wt.

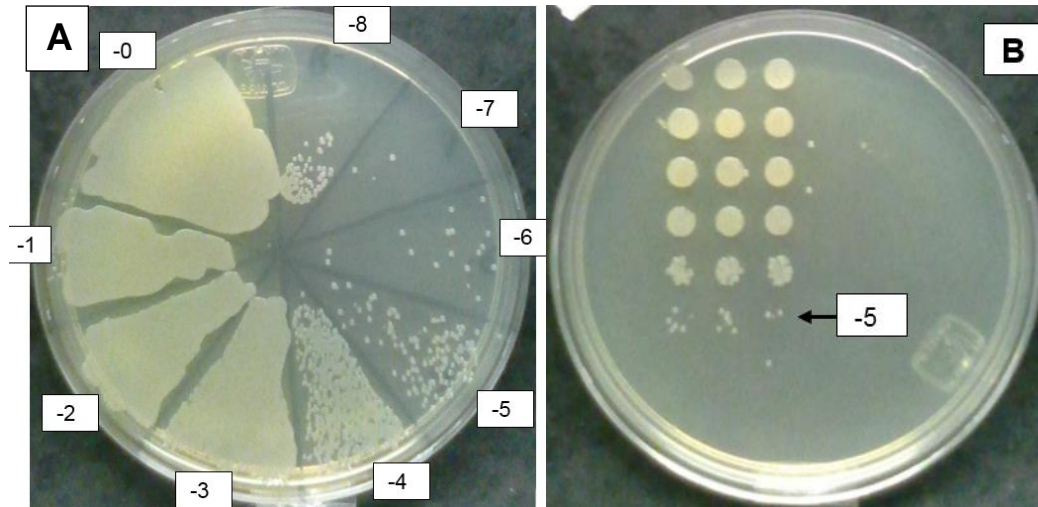
El experimento de desecación realizado en una incubadora estática, en el cual se comparó la supervivencia de *P. putida* KT2440 Wt y Ad a 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se obtuvo como resultado una mayor supervivencia de la Ad. A los 31 días de desecación, la Ad mostró una UFC/ml muy por encima de la Wt (Figura 7).



**Figura 7.** Supervivencia a desecación de *P. putida* KT2440 Wt y Ad en la incubadora estática.

Sin embargo cuando no se tienen controlados los factores de humedad y temperatura durante el experimento, puede influir en la supervivencia de las dos cepas y los resultados pueden variar (Anexo 3).

Los datos de supervivencia obtenidos fueron calculados contando UFC con el método de Extendido en Placa (Spread Plate) que en comparación con el método de Sellado en Placa Masivo, permitió una mejor distribución, observación y por lo tanto conteo de UFC. Como se observa en la Figura 8 el conteo fue posible a la dilución  $-5$  teniendo como resultado en el extendido en placa  $5.5 \times 10^8$  UFC/ml y en el sellado en placa  $3.5 \times 10^7$  UCF/ml.

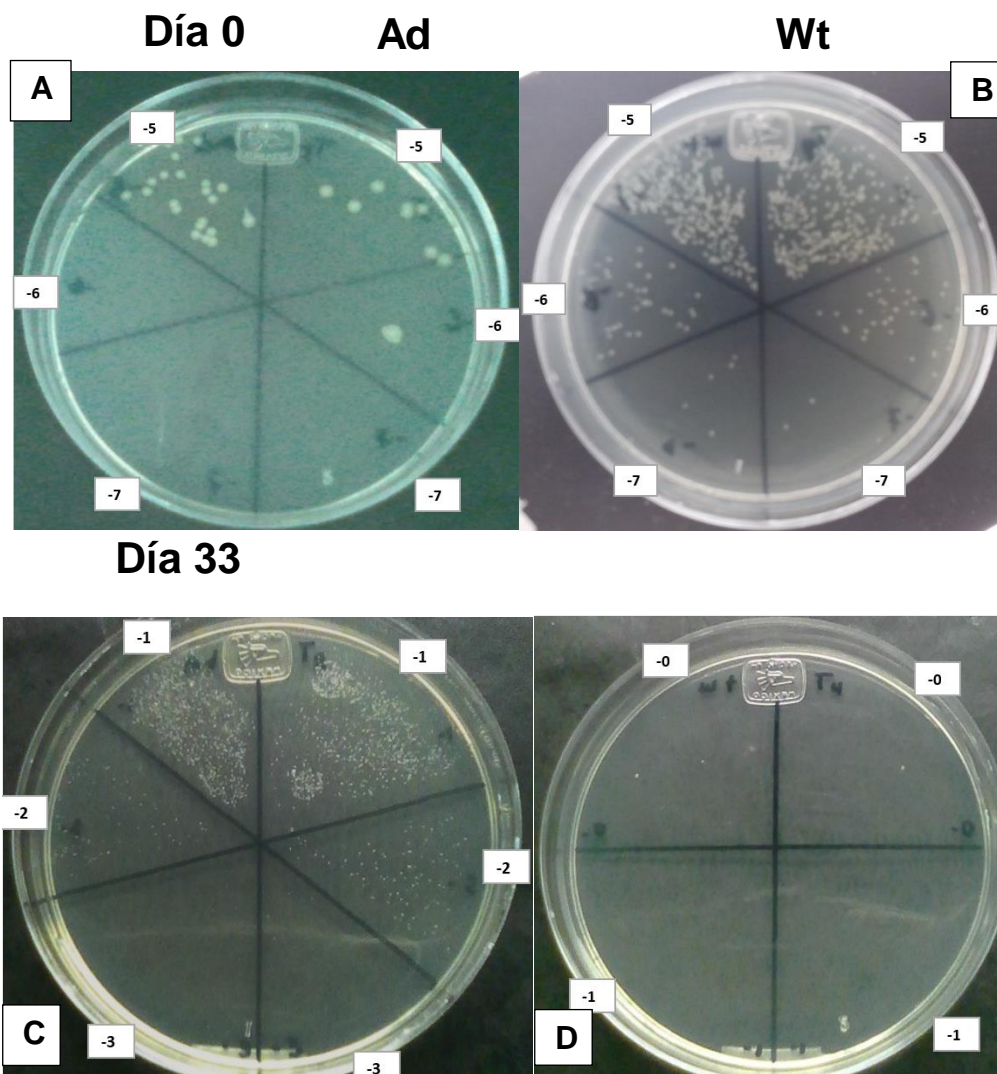


**Figura 8.** Comparación de las dos técnicas de monitoreo de un cultivo de 24 horas de crecimiento, A) Técnica Extendido en Placa B) Técnica Sellado en Placa donde el conteo de UFC se hizo a la dilución -5.

En las figuras 9 y 10 se muestra el crecimiento de la cepa silvestre y adaptada a peróxido de hidrógeno desde el día 0 hasta el día 33; al inicio del experimento cuando se contaron las unidades formadoras de colonias la Wt tuvo un mayor número de bacterias que la Ad. Al final del experimento y al hacer el conteo de UFC la Ad tuvo un mayor número de colonias que la WT, demostrando tener mayor resistencia a la desecación permitiéndole sobrevivir al estrés.

Días	Ad	Wt
0	$4.7 \times 10^8$ UFC/ml	$5.2 \times 10^9$ UFC/ml
33	$5.2 \times 10^5$ UFC/ml	$1.8 \times 10^3$ UFC/ml

**Figura 9.** Comparación de UFC/ml del experimento de desecación del día 0 y el día 33, en el cual la *P. putida* KT2440 Ad demostró resistencia a la desecación.

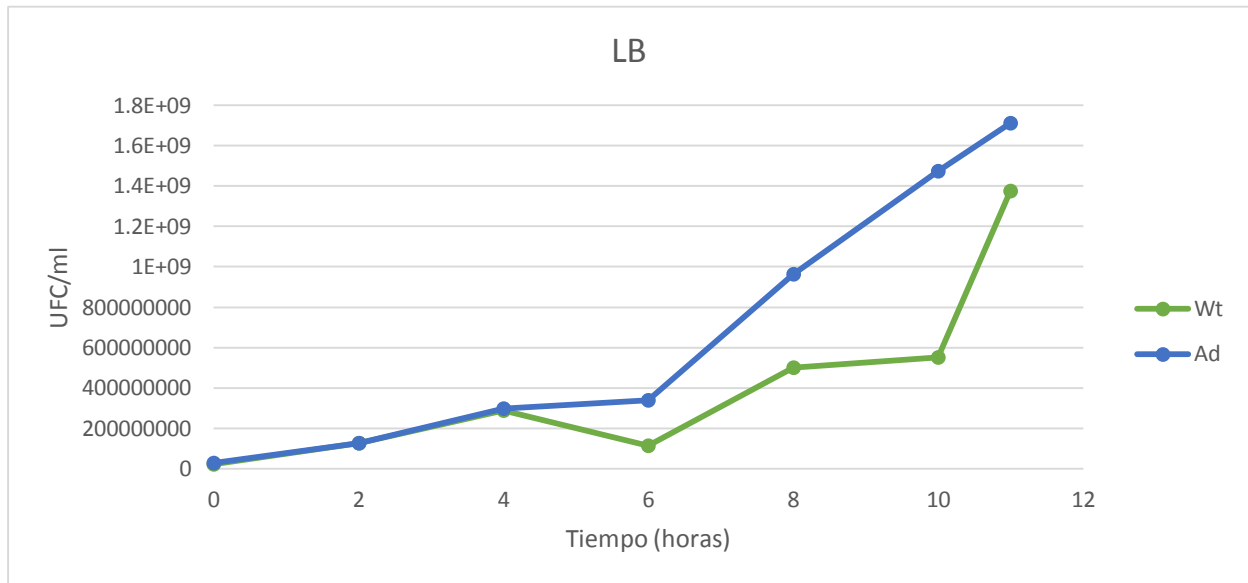


**Figura 10.** Experimento de desecación, A) *P. putida* KT2440 Ad del día 0 el conteo de UFC se hizo a la dilución -6, B) *P. putida* KT2440 Wt día 0 el conteo de UFC se hizo a la dilución -6, C) *P. putida* KT2440 Ad del día 33 el conteo de UFC se hizo a la dilución -2, D) *P. putida* KT2440 Wt día 33 el conteo de UFC se hizo a la dilución -0.

Para corroborar que la bacteria que se adaptó a  $H_2O_2$  continuó siendo *P. putida* KT2440 y no se trató de otra bacteria resultado de una contaminación; se realizó un perfil de restricción mediante el kit “Wizard® Genomic DNA Purification” (PROMEGA), donde se amplificó el 16S y se hizo la restricción con la enzima HhaI; efectivamente se observa que la Ad tiene el mismo patrón de bandas que la WT tomada a partir de un glicerol (Anexo 6).

## Curva de Crecimiento

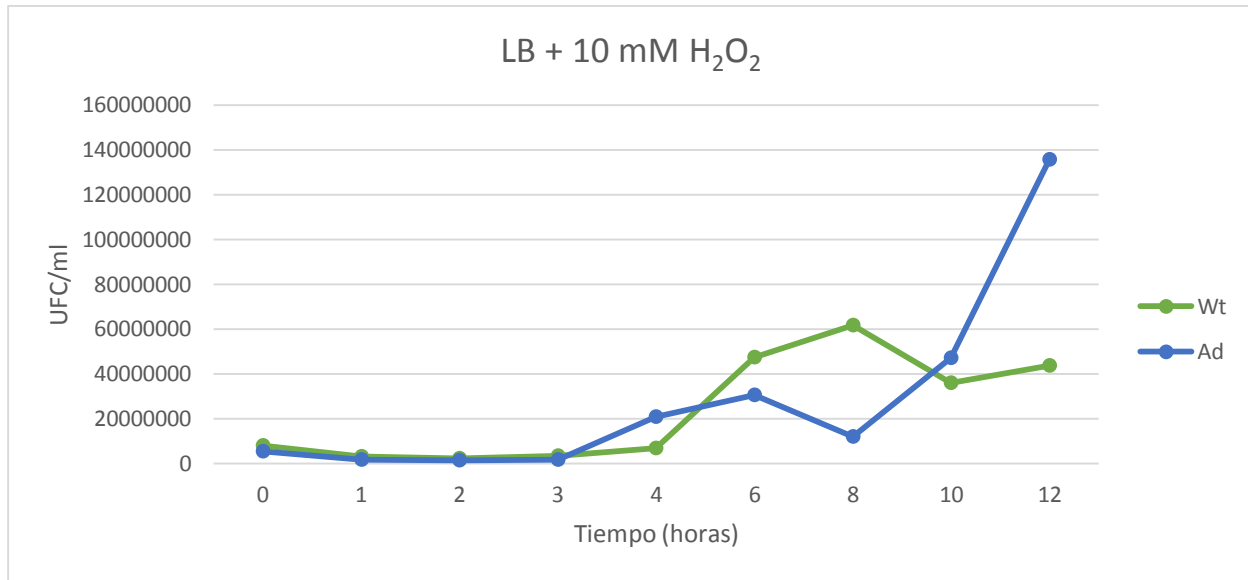
El comportamiento de las poblaciones de *P. putida* KT2440 Ad y Wt en la evaluación de crecimiento en medio LB sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se pudo observar que durante las primeras cuatro horas el crecimiento de las dos poblaciones no demuestra alguna diferencia; posterior a esas cuatro primeras horas la Ad tiene un crecimiento más acelerado que la Wt. Al contar las UFC al final del experimento en la Ad se registró un valor de  $1.7 \times 10^9$  UFC/ml, por otro lado la Wt tuvo como resultado  $1.3 \times 10^9$  UFC/ml (Figura 11).



**Figura 11.** El crecimiento de la *P. putida* KT2440 Ad durante las primeras cuatro horas es similar a la *P. putida* KT2440 Wt, pasando la cuarta hora la diferencia en la velocidad del crecimiento comienza a ser evidente en las dos poblaciones.

También se realizó una curva de crecimiento añadiendo al medio LB una concentración de 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con el objetivo de comparar el comportamiento tanto de *P. putida* KT2440 Wt como de *P. putida* KT2440 Ad durante un periodo de 12 horas. A diferencia de la curva donde el medio LB no tenía ningún estresor la similitud en el crecimiento solo se percibe en las primeras tres horas, las siguientes horas es evidente la divergencia de las dos poblaciones; al contar las UFC la Ad tuvo  $13.5 \times 10^7$  UFC/ml al contrario de la Wt que tuvo  $4.3 \times 10^7$  UFC/ml.

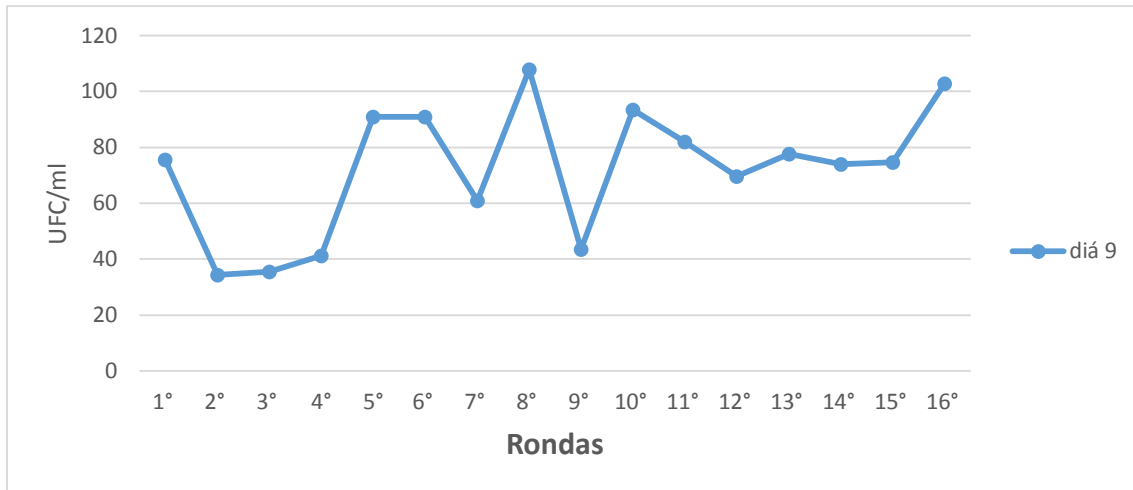
Durante las primeras 10 horas no se observó diferencia; sin embargo pasadas esas horas la Ad continua con su crecimiento, es posible argumentar que la Ad durante sus primeras horas en exposición con el estresor hace un ajuste en el mecanismo de su metabolismo para resistir y sobrevivir lo que no posible ese comportamiento con la Wt y se obtiene como resultado la muerte de la población.



**Figura 12.** Se demuestra el crecimiento de *P. putida* KT2440 Wt como de *P. putida* KT2440 Ad en un medio de cultivo con un estresor como es el  $H_2O_2$ , durante las primeras 8 horas del experimento pareciera que la reacción de la Ad es la inminente muerte de la población como ocurre con la Wt cuando es expuesta a esas concentraciones.

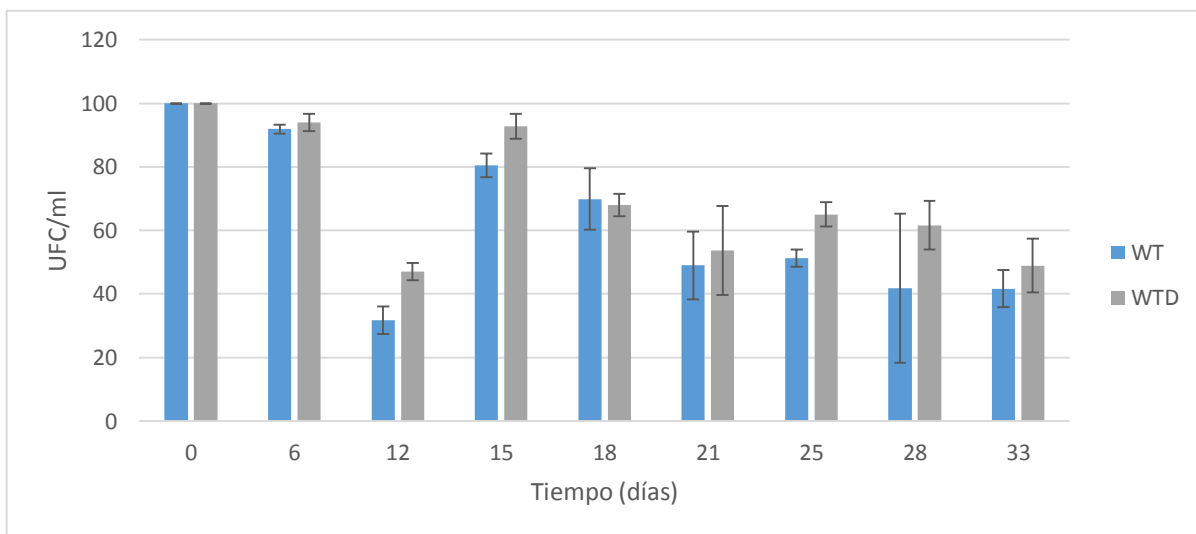
### Adaptación a Deseccación

Los resultados de la adaptación a desecación demostraron la resistencia de *P. putida* KT2440 al estresor superando los 9 días como se había establecido en experimentos anteriores, se comprobó que inclusive al hacer el monitoreo a los 40 días de estar expuesta a desecación hubo presencia de UFC en la placa de LB con una BSR de 44.8 (Figura 13).



**Figura 13.** En la gráfica se observa el comportamiento de la *P. putida* KT2440 los días 9 de su adaptación a desecación.

Se comparó la tasa de supervivencia de la *P. putida* KT2440 WtD con la *P. putida* KT2440 Wt por un periodo de 33 días, el resultado al igual que como sucedió con la Ad fue la resistencia al estresor; por lo que le permitió sobrevivir por más días con una UFC mayor que la silvestre (Figura 14).

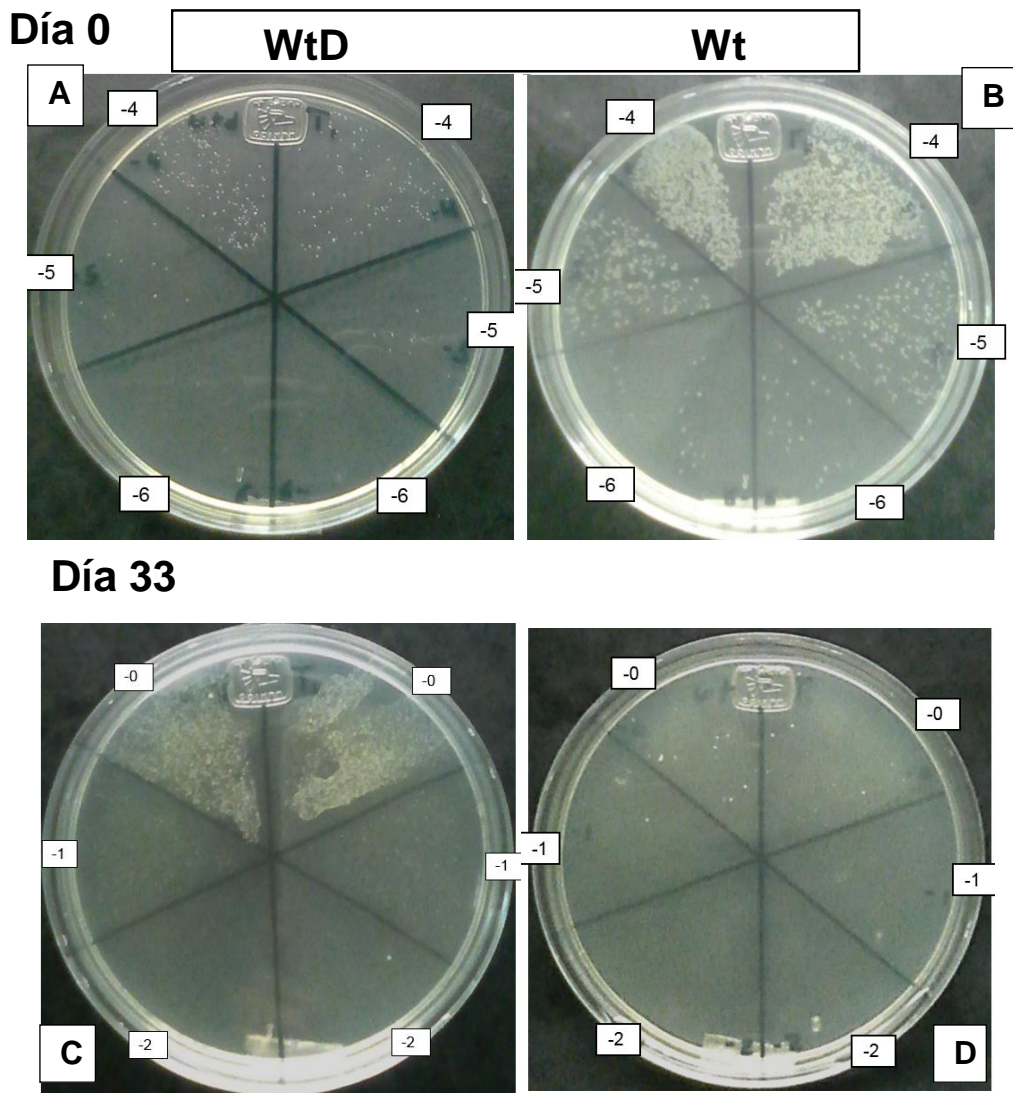


**Figura 14.** Supervivencia a desecación de *P. putida* KT2440 Wt y WtD, donde se observa la resistencia de la WtD durante 33 días y la constante disminución de UFC de la Wt.

En las figuras 15 y 16 se observan los resultados de someter a desecación durante un periodo de 33 días a la *P. putida* KT2440 Wt y WtD, en el cual la supervivencia de la adaptada a desecación y teniendo una UFC/ml al final del experimento mayor que la Wt, demuestra que las rondas de desecación a las que fue sometida fueron suficientes como para hacerla resistente a esta prueba.

Días	WtD	Wt
0	$1.6 \times 10^8$ UFC/ml	$1.1 \times 10^9$ UFC/ml
33	$4.9 \times 10^4$ UFC/ml	$4.9 \times 10^3$ UFC/ml

**Figura 15.** Comparación de UFC/ml del experimento de desecación del día 0 y el día 33, en el cual la *P. putida* WtD demostró resistencia al estresor.



**Figura 16.** Experimento de desecación, A) *P. putida* KT2440 WtD del día 0 el conteo de UFC se hizo a la dilución -5, B) *P. putida* KT2440 Wt día 0 el conteo de UFC se hizo a la dilución -6, C) *P. putida* KT2440 WtD del día 33 el conteo de UFC se hizo a la dilución -1, D) *P. putida* KT2440 Wt día 33 el conteo de UFC se hizo a la dilución -1.

### 13.- Discusión

El objetivo principal del estudio de generar bacterias resistentes a desecación a partir de adaptaciones a concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y a la misma desecación resultó ser efectiva, lo que demuestra que a pesar de ser un procedimiento tardado y laborioso permitieron cumplir con los objetivos.

Los resultados de supervivencia de *P. putida* KT2440 cuando se expone a concentraciones altas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede derivar tanto en la muerte de la población si se excede los niveles de tolerancia o en la adaptación si no se rebasan; lo anterior nos permitió conocer y controlar las concentraciones que se consideraban como tóxicas; dejando a las bacterias adaptarse y generar una respuesta efectiva al estrés. Sin embargo cuando se hicieron las pruebas de supervivencia a desecación se hizo evidente y primordial que el factor tiempo influiría sobremanera en los resultados; es decir, de haber continuado con las adaptaciones y llegar a una concentración mayor a 10 mM los resultados en el conteo de UFC/ml en comparación con la *P. putida* KT2440 Wt hubiera sido más notable.

No obstante, se demuestra que aunque el periodo de tiempo en el que estuvo sometida la *P. putida* KT2440 fue de 6 meses, fue suficiente para resistir largos periodos de tiempo en desecación teniendo en cuenta los experimentos de desecación hechos en *P. putida* KT2440 por Muñoz *et. al.*, (2006); con lo que se puede argumentar que si se toma en cuenta la descripción de la *P. putida* KT2440 y su versatilidad para vivir en diversos ambientes, la respuesta para descifrar los mecanismos de tolerancia a la desecación pudieran estar ligados a una modificación de la membrana hasta una modificación en la producción de enzimas vinculadas a las defensas antioxidantes.

En los resultados de los experimentos hechos con *P. putida* KT2440 Wt y Ad, cuando se realizó la curva de crecimiento en medio LB y LB+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permitió observar que la adaptación no solo le generó resistencia a desecación sino que también tuvo un impacto en la velocidad de crecimiento de la población Ad en comparación con la Wt.

Por otro lado la adaptación de *P. putida* KT2440 a rondas de desecación se obtuvo un resultado satisfactorio, al hacer la prueba de supervivencia a desecación y observar su resistencia en comparación de *P. putida* KT2440 Wt de otros experimentos; que si bien la diferencia de UFC entre la WtD y la Wt no es mucha como lo fue con la Ad, si sobrevivió más de lo esperado. Aunque si se sugiere que como la Ad el tiempo al que está expuesto al estresor es determinante para desarrollar mecanismos de resistencia y por consiguiente superar los estándares de una prueba de desecación.

#### **14.- Conclusión**

La generación de bacterias *P. putida* KT2440 Ad mediante la técnica de adaptación evolutiva de laboratorio (ALE) confirmó mejorar significativamente la supervivencia a desecación en comparación *P. putida* KT2440 Wt cuando se somete a la misma prueba. Inclusive fue posible demostrar que la adaptación al estresor tuvo una influencia en su velocidad de crecimiento y el daño a membrana. En cuanto a la *P. putida* KT2440 WtD demostró, que si bien es un proceso lento y tardado los efectos y resultados en la resistencia al estresor son eficientes.

## 15.- REFERENCIAS

- Aldsworth, T.G. *et al.* (1999). Bacterial suicide through stress. *Cell. Mol. Life Sci.* 56, 378–383.
- Alpert, P., and Oliver, M. J. (2002). 1 Drying Without Dying. *Desiccation and survival in plants: Drying without dying*, 3.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., and Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(17), 7915-7922.
- Bagdasarian, M., Lurz, R., Rückert, B., Franklin, F. C. H., Bagdasarian, M. M., Frey, J., and Timmis, K. N. (1981). Specific-purpose plasmid cloning vectors II. Broad host range, high copy number, RSF 1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene*, 16(1), 237-247.
- Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology advances*, 16(4), 729-770.
- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., and Hernández, J. P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*, 378(1-2), 1-33.
- Bennett, A. F., and Hughes, B. S. (2009). Microbial experimental evolution. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 297(1), R17-R25.
- Bewley J.D. (1973). Desiccation and protein synthesis in the moss *Tortula ruralis*. *Can. J. Bot.* 51, 203–206.
- Billi, D., Wright, D. J., Helm, R. F., Prickett, T., Potts, M., and Crowe, J. H. (2000). Engineering desiccation tolerance in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 66(4), 1680-1684.
- Billi, D., and Potts, M. (2002). Life and death of dried prokaryotes. *Research in microbiology*, 153(1), 7-12.
- Birtles, R. J., Rowbotham, T. J., Storey, C., Marrie, T. J. and Raoult, D. (1997). Chlamydia-like obligate parasite of free-living amoebae. *Lancet* 349, 925-926.

- Boddey, R. M., and Dobereiner, J. (1988). Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for future research. *Plant and soil*, 108(1), 53-65.
- Botha, W. J., Jaftha, J. B., Bloem, J. F., Habig, J. H., and Law, I. J. (2004). Effect of soil bradyrhizobia on the success of soybean inoculant strain CB 1809. *Microbiological research*, 159(3), 219-231.
- Boveris, A., and Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal*, 134(3), 707-716.
- Boveris, A. (2005). La evolución del concepto de radicales libres en biología y medicina. *Ars pharmaceutica*, 46(1), 85-92.
- Bromfield, E. S., Lewis, D. M., and Barran, L. R. (1985). Cryptic plasmid and rifampin resistance in *Rhizobium meliloti* influencing nodulation competitiveness. *Journal of bacteriology*, 164(1), 410-413.
- Burr, T. J., Schroth, M. N., and Suslow, T. (1978). Increased potato yields by treatment of seedpieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* [Bacterization]. *Phytopathology*.
- Catroux, G., Hartmann, A., and Revellin, C. (2001). Trends in rhizobial inoculant production and use. *Plant and soil*, 230(1), 21-30.
- Chakravarty, D., Banerjee, M., Bihani, S. C., and Ballal, A. (2015). A Salt-Inducible Mn-Catalase (KatB) Protects Cyanobacterium from Oxidative Stress. *Plant physiology*, pp-01632.
- Chanway, C. P. (1997). Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: an emerging technology for reforestation. *Forest Science*, 43(1), 99-112.
- Clegg, J. S. (2001). Cryptobiosis a peculiar state of biological organization. *Comp. Biochem. Phys. B-Biochem. Mol. Biol.* 128, 613–62.
- Cooper, R. (1959). Bacterial fertilizers in the Soviet Union. *Soils Fert*, 22(5), 327-333.
- Cormier J., and Janes M. (2014). A double layer plaque assay using spread plate technique for enumeration of bacteriophage MS2. *Journal of virological methods*, 196, 86-92.

- Corral Lugo A., Morales García Y. E., Pazos-Rojas L. A., Ramírez-Valverde A., Martínez Contreras R. D. and Muñoz-Rojas J. (2012). Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de “Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo”, Laboratorio Ecología Molecular Microbiana, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
- Crowe, J. H., Hoekstra, F. A., and Crowe, L. M. (1992). Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, 54(1), 579-599.
- Danks, H. V. (2000). Dehydration in dormant insects. *Journal of Insect Physiology*, 46(6), 837-852.
- Deaker, R., Roughley, R. J., and Kennedy, I. R. (2004). Legume seed inoculation technology—a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(8), 1275-1288.
- de Castro, A. G., Bredholt, H., Strøm, A. R., and Tunnacliffe, A. (2000). Anhydrobiotic engineering of gram-negative bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 66(9), 4142-4144.
- Freitas, J. R. D., and Germida, J. J. (1990). Plant growth promoting rhizobacteria for winter wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, 36(4), 265-272.
- Dey R., Pal K. K., Bhatt D. M. and Chauhan, S. M. (2004). Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachishypogaea* L.) by application of plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiol. Res.* 159, 371–394. doi: 10.1016/j.micres.2004.08.004.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P. and Brener, S. (2001). Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Functional Plant Biology*, 28(9), 871-879.
- Espinosa-Urgel, M., Kolter, R., and Ramos, J. L. (2002). Root colonization by *Pseudomonas putida*: love at first sight. *Microbiology*, 148(2), 341-343.
- Fages, J., and Arsac, J. F. (1991). Sunflower inoculation with *Azospirillum* and other plant growth promoting rhizobacteria. *Plant and Soil*, 137(1), 87-90.
- Fages, J. (1994). *Azospirillum inoculants and field experiments* (pp. 87-109). Boca Raton, FL, USA: CRC Press.

- França, M. B., Panek, A. D., and Eleutherio, E. C. A. (2007). Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146(4), 621-631.
- Fridovich, I. (1975). Oxygen: boon and bane. *American Scientist*, 63(1), 54.
- Frommel, M. I., Nowak, J., and Lazarovits, G. (1993). Treatment of potato tubers with a growth promoting *Pseudomonas* sp.: Plant growth responses and bacterium distribution in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 150(1), 51-60.
- Gaff, D. F. (1989). Responses of desiccation tolerant 'resurrection' plants to water stress. *Structural and Functional Responses to Environmental Stress*; ed. Kreeb\_KH, Richter\_H, Hinckley\_TM. SPB Academic Publishing, The Hague, 308pp. Jod, 581.
- Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 4, 1109–1114.
- Glick, B. R., Liu, C., Ghosh, S., and Dumbroff, E. B. (1997). Early development of canola seedlings in the presence of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Soil Biology and Biochemistry*, 29(8), 1233-1239.
- Gutjahr C. and Paszkowski U. (2009). Weights in the balance: jasmonic acid and salicylic acid signaling in root-biotroph interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22, 763–772. doi: 10.1094/MPMI-22-7-0763.
- Hansen, J. M., Go, Y. M., and Jones, D. P. (2006). Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 46, 215-234.
- Harańczyk, H., Gaździński, S., and Olech, M. (1998). Initial stages of lichen hydration observed by proton magnetic relaxation. *New phytologist*, 138(2), 191-202.
- Hardison R. C. Comparative genomics. *PLoS Biol* 2003, 1:E58.
- Hellriegel, H. (1886). Welche stickstoffquellen stehen der Pflanze zu Gebote. *Tageblatt der*, 59, 290.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., and Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158, 17–25. doi: 10.1099/mic.0.052274-0.

- Hoekstra, F. A. (2005). Differential longevity in desiccated anhydrobiotic plant systems. *Integrative and Comparative Biology*, 45(5), 725-733.
- Hoffmann-Hergarten S., Gulati M. K. and Sikora R. A. (1998). Yield response and biological control of *Meloidogyne incognita* on lettuce and tomato with rhizobacteria. *J. Plant Dis. Protect.* 105: 349–358.
- Jeon, J. S., Lee, S. S., Kim, H. Y., Ahn, T. S., and Song, H. G. (2003). Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms. *J. Microbiol.* 41, 271–276.
- Kapulnik, Y., Okon, Y., Waisel, Y., Eshel, A., and Kafkafi, U. (2002). Plant growth promotion by rhizosphere bacteria. *Plant roots: the hidden half*, (Ed. 3), 869-885.
- Khan A. G. (2005). Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18, 355–364. doi: 10.1016/j.jtemb.2005.02.006.
- Klein, D. A., Salzwedel, J. L., and Dazzo, F. B. (1990). Microbial colonization of plant roots. *Biotechnology of plant-microbe interactions.*, 189-225.
- Kloepper, J. W., Schroth, M. N., and Miller, T. D. (1980). Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology*, 70(11), 1078-1082.
- Kloepper J. W., Hume D. J., Scher F. M., Singleton C., Tipping B., Laliberté M., Frauley K., Kutchaw T., Simonson C., Lifshitz R., Zaleska I. and Lee L. (1988). Plant growth-promoting rhizobacteria on canola rapeseed. *Plant Dis.* 72: 42–46.
- Kumar A., Maurya B. R. and Raghuwanshi R., (2014). Isolation and characterization of PGPR and their effect on growth, yield and nutrient content in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 3, 121–128.
- Leslie S. B. et. al. (1995) Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592–3597.
- Li D. M. and Alexander M. (1988). Co-inoculation with antibiotic producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. *Plant Soil* 108:211–219.

- Lucy M., Reed E. and Glick B. R. (2004). Application of free living plant-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 86, 1–25. doi: 10.1023/B:ANTO.0000024903.10757.6e.
- Marques A. P. G. C., Pires C., Moreira H., Rangel A. O. S. S. and Castro P. M. L. (2010). Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. *Soil Biol. Biochem.* 42, 1229–1235. doi: 10.1016/j.soilbio.2010.04.014.
- Manzanera M., de Castro A. G., Tondervik A., Rayner-Brandes M., Strom A. R. and Tunnacliffe A. (2002). Hydroxyectoine is superior to trehalose for anhydrobiotic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4328–4333.
- Manzanera M., Vilchez S. and Tunnacliffe A. (2004). High survival and stability rates of *Escherichia coli* dried in hydroxyectoine. *FEMS Microbiol. Let.* 233:347–352.
- Martínez E. Infecciones por *Pseudomonas*. *El Nuevo Diario*, 10 de marzo 2001, p.2.
- Mehnaz S., Kowalik T., Reynolds B. and Lazarovits G. (2010). Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. *Soil Biol. Biochem.* 42, 1848–1856. doi: 10.1016/j.soilbio.2010.07.003.
- Mishustin E. N. and Naumova A. N. (1962). Bacterial fertilizers: Their effectiveness and mode of action. *Mikrobiologiya* 31: 543–555.
- Molina L., Ramos C., Duque E., Ronchel M. C., García J. M., Wyke L. and Ramos J. L. (2000). Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biol. Biochem.* 32:315–321.
- Muñoz Arenas L. C., Pazos Rojas L. A., Morales García Y. E., Toribio Rosales C., Bustillos-Cristales M. R. and Muñoz-Rojas J. (2006). Supervivencia de *P. putida* KT2440 a condiciones de desecación ambiental. *V Encuentro Nacional de Biotecnología del IPN. México, DF*, 50-54.
- Nakazawa T. (2002). Travels of a *Pseudomonas*, from Japan around the world. *Environ, Microbiol.* 4:782–786.

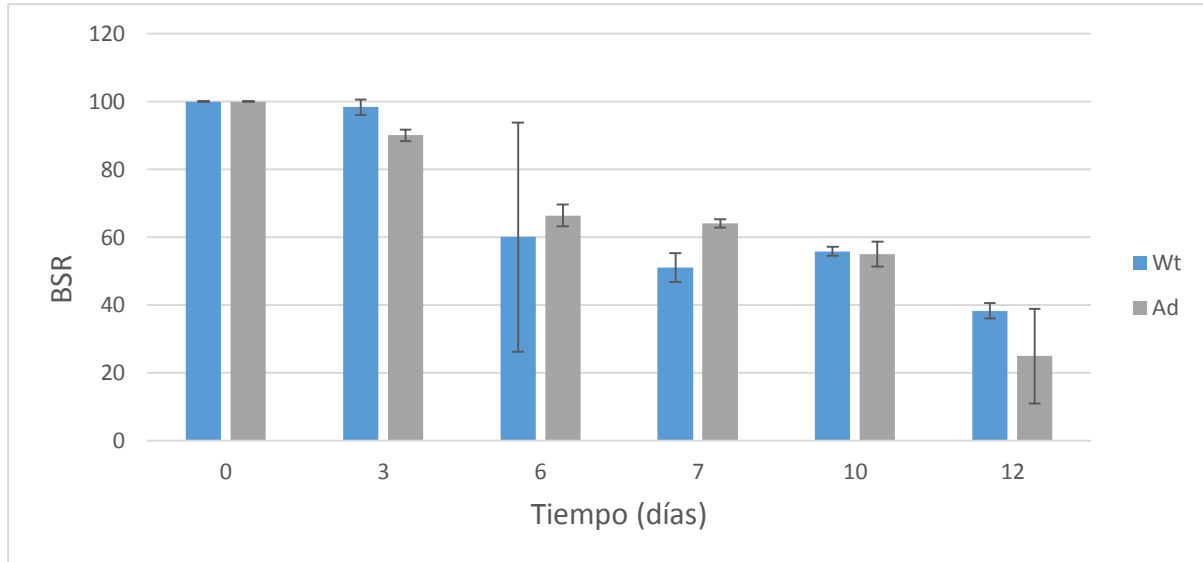
- Okon Y. and Labandera-Gonzalez C. A. (1994). Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 26: 1591–1601.
- Ozturk A., Caglar O. and Sahin F. (2003). Yield response of wheat and barley to inoculation of plant growth promoting rhizobacteria at various levels of nitrogen fertilization. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 166, 262–266. doi: 10.1002/jpln.200390038.
- Parke J. L. (1991). Root colonization by indigenous and introduced microorganisms. In: Keister D.L. and Cregan P.B. ed., *The Rhizosphere and Plant Growth*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp 33–42.
- Planchamp C., Glauser G. and Mauch-Mani B. (2015). Root inoculation with *Pseudomonas putida* KT2440 induces transcriptional and metabolic changes and systemic resistance in maize plants, Laboratory of Molecular and Cell Biology, Institute of Biology, University of Neuchâtel, Neuchâtel, Switzerland.
- Polyanskaya L. M., Vedina O. T., Lysak L. V. and Zvyagintev D. G. (2000). The growth-promoting effect of *Beijerinckia mobilis* and *Clostridium* sp. cultures on some agricultural crops. *Microbiol.* 71: 109–115.
- Proctor M. C. F. (2003). Comparative ecophysiological measurements on the light responses, water relations and desiccation tolerance of the filmy ferns *Hymenophyllum wilsonii* Hook and *H. tunbrigense* (L.) Smith. *Ann. Bot.* 91:717–727.
- Sahin F., Cakmakci R. and Kanta F. (2004). Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N<sub>2</sub>-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant Soil* 265, 123–129. doi: 10.1007/s11104-005-0334-8.
- Schena M., Shalon D., Davis R. and Brown P. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270:467–470.
- Sies H. *Oxidative Stress*. San Diego: Academic Press, 1985.
- Stephens J. H. G. and Rask H. M. (2000). Inoculant production and formulation. *Field Crops Res* 65:249–258.

- Streeter J. G. (2003). Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. *J. Appl. Microbiol.* 95:484–491.
- Suslow T. V. and Schroth M. N. (1982). Rhizobacteria of sugar beets: Effects of seed application and root colonization on yield. *Phytopathol.* 72: 199–206.
- Timmis K. N. (2002) *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environ Microbiol* 4: 779-781.
- Tunnacliffe A., de Castro A. G. and Manzanera M. (2001). Anhydrobiotic engineering of bacterial and mammalian cells: Is intracellular trehalose sufficient? *Cryobiology* 43:124–132.
- Vallejos V. R., Díaz Fierros F. and De la Rosa D. (2005). Impacto sobre los recursos edáficos. In: Evaluación de los Impactos del cambio climático en España (ECCE).
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., Van der Heijdt, W. H. W., Wendehenne, D., and Pugin, A. (2008). Early responses of tobacco suspension cells to rhizobacterial elicitors of induced systemic resistance. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21, 1609–1621. doi: 10.1094/MPMI-21-12-1609.
- Williams P. A. and Murray K. (1974). Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid. *J Bacteriol* 120: 416-423.
- Winkler, J., Reyes, L. H., and Kao, K. C. (2013). Adaptive laboratory evolution for strain engineering. *Systems Metabolic Engineering: Methods and Protocols*, 211-222.
- Woodward G., Perkins D. M. and Brown L. E. (2010). Climate change and freshwater ecosystems: impacts across multiple levels of organization. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 365, 2093–2106.
- Zamioudis, C., and Pieterse, C. M. J. (2012). Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25, 139–150. doi: 10.1094/MPMI-06-11-0179
- Zhang J., Liu J., Meng L., Ma Z., Tang X., Cao Y., et al. (2012). Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat roots by

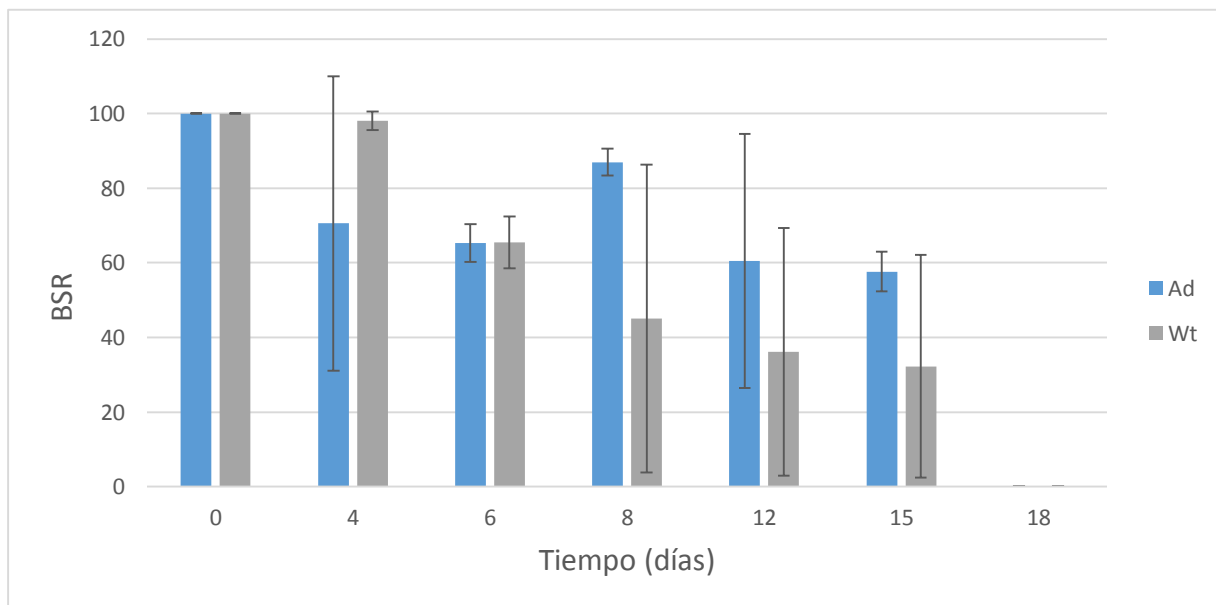
wheat germ agglutinin labeled with fluorescein isothiocyanate. *J. Microbiol.* 50, 191–198. doi: 10.1007/s12275-012-1472-3.

## 16.- ANEXOS

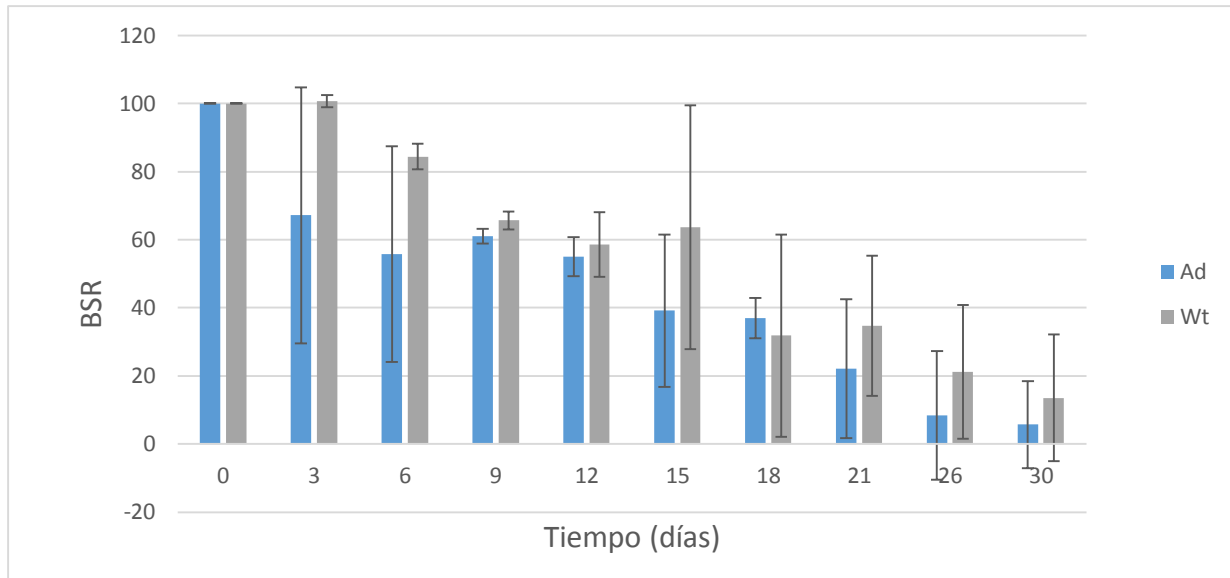
Experimentos de desecación en estufa de cultivo.



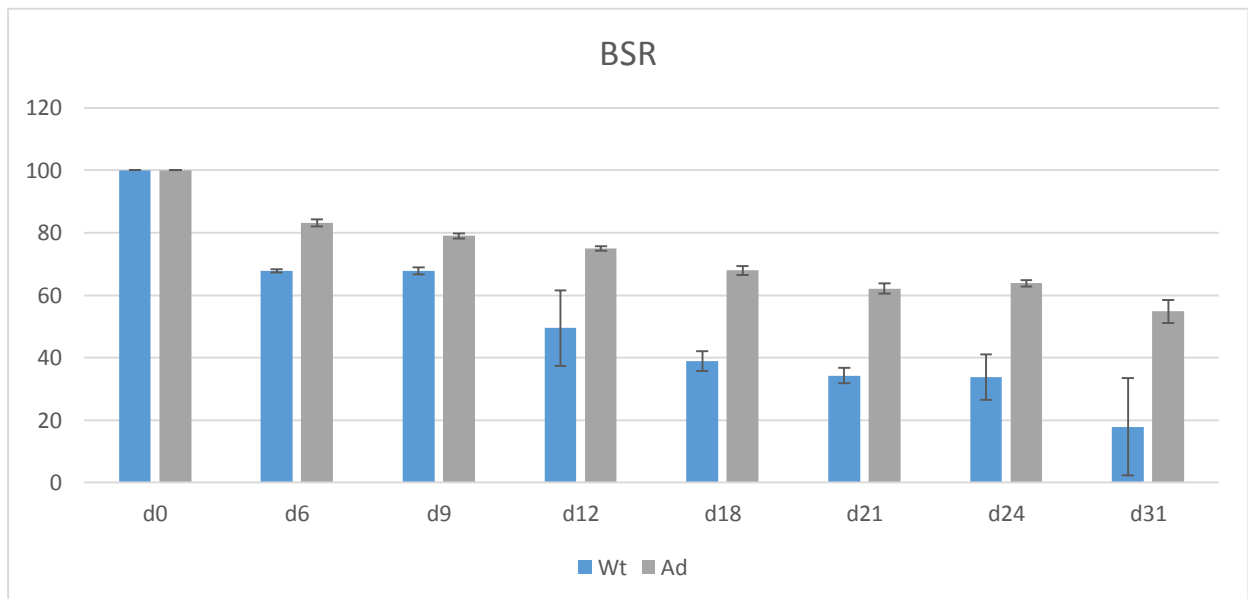
**Anexo 1.** Primer experimento de desecación donde se compara la supervivencia de *P. putida* KT2440 WT y Ad a 4.6 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Anexo 2.** Segundo experimento de desecación donde se aumentó la concentración del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 5.7 mM para la adaptación de *P. putida* KT2440.



**Anexo 3.** En la gráfica se percibe la variación de la tasa de supervivencia *P. putida* KT2440 Wt y Ad, en una prueba de desecación cuando no se controlan los factores de humedad y temperatura.



**Anexo 4.** La resistencia a desecación de la *P. putida* KT2440 Ad a 10mM de  $H_2O_2$  es evidente la diferencia de la *P. putida* KT2440 Wt.



# DESARROLLO DE TOLERANCIA A DESECACIÓN EN CEPAS DE *Pseudomonas putida* KT2440



Marisol Vázquez- Quiroz<sup>1</sup>, Lesther López-Cruz<sup>1</sup>, Jesús Muñoz-Rojas<sup>1</sup>, Antonino Baez<sup>1</sup>,  
<sup>1</sup>Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

## Introducción y objetivo

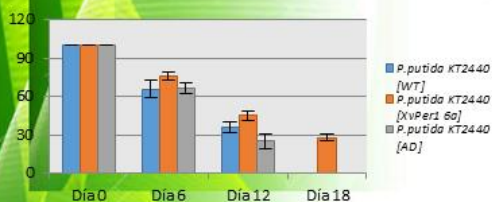
Las bacterias PGPR han sido utilizadas para el desarrollo de los llamados inoculantes microbianos. Sin embargo la eficiencia de estos inoculantes es afectada al disminuir la supervivencia de las bacterias por diversos factores ambientales, entre ellos la escases de agua, que conlleva a la desecación. La deshidratación es conocida por causar daño severo a los organismos a nivel de membrana así como de sus proteínas[1,2], además de promover el incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS)[3]. El presente trabajo tiene como objetivo desarrollar tolerancia a los procesos de desecación en la bacteria *Pseudomonas putida* KT2440 para mejorar su estabilidad como inoculante.

## Materiales y Métodos

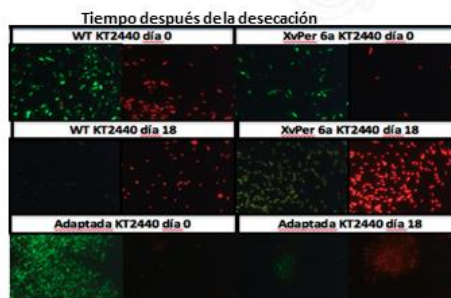
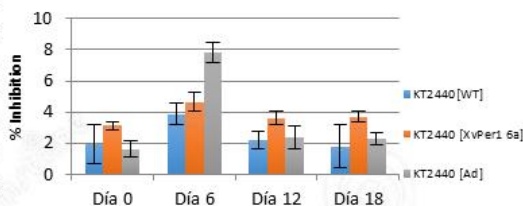
Tres cepas de *Pseudomonas putida* KT2440 fueron sometidas a desecación; la cepa silvestre sensible a desecación, una cepa modificada con un gen integrado en su cromosoma denominado XvPer1 6a que le confiere resistencia a estrés salino y desecación y una cepa adaptada crecida bajo estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las tres cepas fueron evaluadas en la fase estacionaria de crecimiento, Se midieron las UFC durante el periodo de desecación y se calculó la BSR (Bacteria Survival Ratio) y se caracterizó la actividad de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD) y se evaluó el daño a membrana por microscopía.

## Resultados

### BSR *Pseudomonas putida* KT2440



### Actividad de SOD en *Pseudomonas putida* KT2440



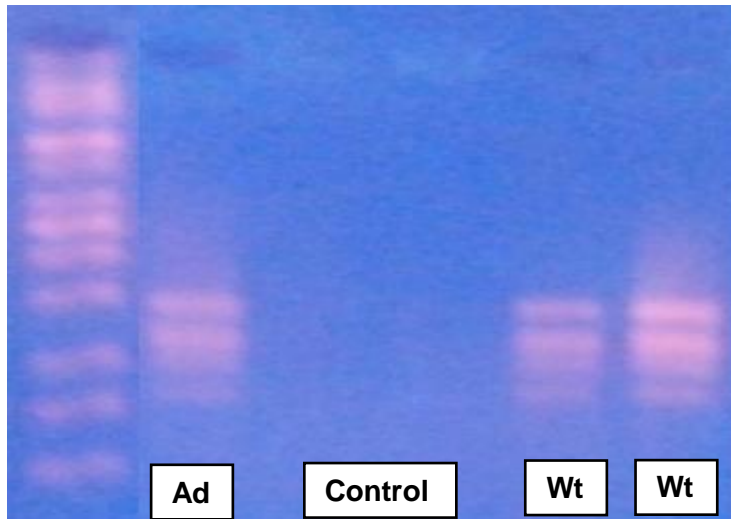
## Conclusiones

La cepa modificada XvPer mostró una mayor tolerancia a la desecación que la silvestre y adaptada a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los estudios realizados sugieren que en la cepa XvPer1 6a tiene una mayor capacidad de dismutar el superóxido, consecuentemente sufre un menor daño en la membrana durante la desecación. La cepa adaptada bajo estrés oxidativo, muestra mayor actividad antioxidante al 6 día de desecación, sin embargo la adaptación previa no le proporciona mayor tolerancia a desecación respecto a la cepa silvestre.

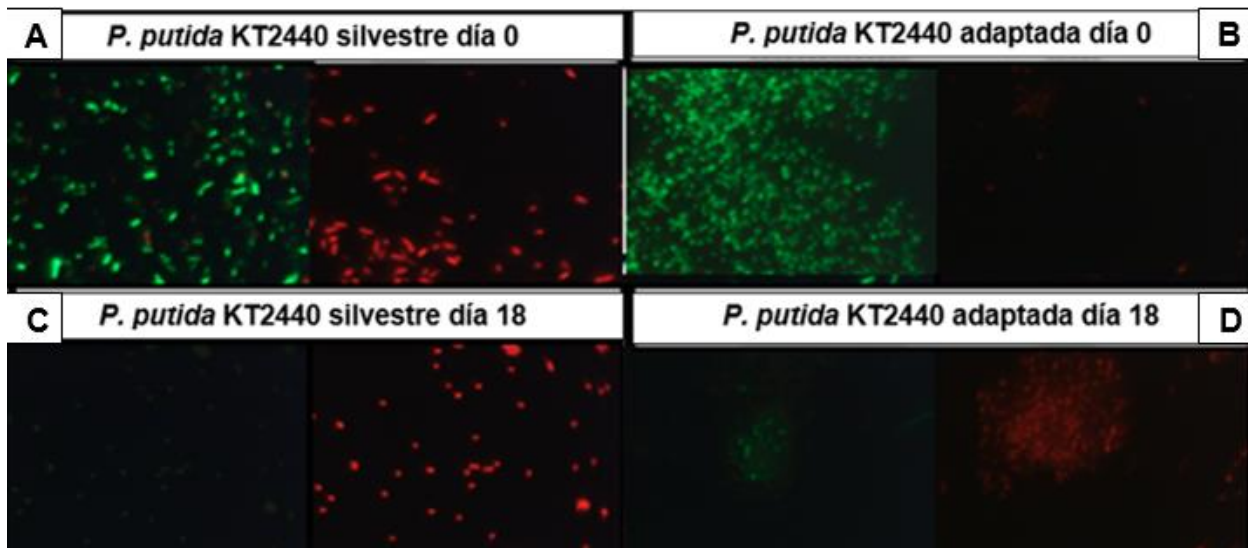
## Referencias

- Prestrelski, S. J., Arakawa, T., & Carpenter, J. F. (1993). Separation of freezing-and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization: II. Structural studies using infrared spectroscopy. *Archives of biochemistry and biophysics*, 303(2), 465-473.
- Potts, M. (1994). Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiological reviews*, 58(4), 755-805.
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology*, 24(10), R453-R462.

**Anexo 5.** Cartel presentado en el Simposio de Modelos Microbianos de Importancia para la Salud, Investigación Básica y Biotecnología; donde se exponen la comparación de la supervivencia a desecación de *P. putida* KT2440 Wt, *P. putida* KT2440 Ad y *P. putida* KT2440 modificada genéticamente.



**Anexo 6.** Carril 1: Marcador molecular, Carril 2: *P. putida* KT2440 Ad, Carriles 3 y 4: controles, Carriles 5 y 6 *P. putida* KT2440 Wt.



**Anexo 7.** Microscopia de fluorescencia hecho a *P. putida* KT2440 Wt y Ad durante una prueba de desecación, donde A) y B) *P. putida* KT2440 Wt y Ad en el día 0 se observan un gran número de células de coloración verde lo que demuestra que no existe daño a

la membrana, 18 días de la prueba C) *P. putida* KT2440 Wt casi no es posible observar células de color verde y si un gran número de células de coloración roja lo que demuestra que la prueba ha generado un daño a la membrana; por otro lado D) *P. putida* KT2440 Ad que aunque si se observan células de coloración roja indicando el daño a membrana también es posible observar células de coloración verde, indicando así que si bien la desecación ha dañado la membrana no ha sido tan drástico como se observa con la silvestre.