

## Rumbo a la generación de inoculantes en polvo a base de *Pseudomonas putida* KT2440

Elizabeth Alonso-Torres<sup>1</sup> **iD**, Yesmin PanecatI Bernal<sup>2</sup> **iD**, José Joaquín Alvarado-Pulido<sup>2</sup> **iD**, Luis Ernesto Fuentes-Ramírez<sup>3</sup> **iD**, Javier Martínez-Morales<sup>4</sup> **iD**, Jesús Muñoz-Rojas<sup>1\*</sup> **iD**, Yolanda Elizabeth Morales-García<sup>1,5\*\*</sup> **iD**

<sup>1</sup>Grupo “Ecology and Survival of Microorganisms”, Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México. <sup>2</sup>Centro de Investigación en Dispositivos Semiconductores, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México. <sup>3</sup>Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México. <sup>4</sup>Laboratorio de Fisiología Microbiana de la Interacción Microorganismo-Hospedero, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México. <sup>5</sup>Facultad de Ciencias Biológicas, Licenciatura en Biotecnología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

Email autores para correspondencia: \*[joymerre@yahoo.com.mx](mailto:joymerre@yahoo.com.mx); \*\*[yolanda.moralesg@correo.buap.mx](mailto:yolanda.moralesg@correo.buap.mx)

**Recibido:** 01 junio 2022. **Aceptado:** 5 septiembre 2022

### RESUMEN

La adición de fertilizantes nitrogenados, pesticidas y herbicidas en los cultivos agrícolas, ha traído enormes consecuencias para el ambiente y la salud de los organismos terrestres. Las bacterias promotoras del crecimiento de plantas podrían ser una alternativa para evitar el uso de esos productos sin arriesgar o disminuir los rendimientos de los cultivos. *Pseudomonas putida* KT2440 es una bacteria capaz de biodegradar compuestos orgánicos y también de promover el crecimiento de plantas; especialmente bajo condiciones de estrés ambiental. Por esta razón, esta bacteria ha sido seleccionada para el diseño de inoculantes de segunda generación. Los inoculantes de segunda generación en la actualidad están en formulaciones líquidas que requieren de refrigeración para mantenerlas estables. Es deseable contar con formulaciones que no requieran energía para su almacenamiento y transporte, por lo que las formulaciones en polvo serían las más apropiadas para mantener la estabilidad hasta su aplicación a un bajo costo. Para conseguir esto se requieren estudios de la tolerancia a la desecación de las bacterias de interés y conocer cómo podemos potenciar la supervivencia de las bacterias benéficas bajo condiciones de estrés por disminución de la actividad de agua. En este trabajo se ha revisado el panorama general del conocimiento que se tiene sobre la supervivencia de *P. putida* KT2440 a la desecación ambiental y la desecación por liofilización, la ayuda por protectores, la función de la membrana bacteriana, así como algunos genes clave que podrían estar implicados en la tolerancia a la desecación de esta bacteria.

**Palabras clave:** *Pseudomonas putida* KT2440; inoculantes bacterianos; desecación; liofilización; supervivencia bacteriana.

## ABSTRACT

The addition of nitrogen fertilizers, pesticides and herbicides in agricultural crops has brought enormous consequences for the environment and the health of terrestrial organisms. Plant growth-promoting bacteria could be an alternative to avoid the use of these products without risking or reducing crop yields. *Pseudomonas putida* KT2440 is a bacterium capable to biodegrade organic compounds and also able to promote plant growth; especially under conditions of environmental stress. For this reason, this bacterium has been selected for the design of “second generation” inoculants. The latter require refrigeration to keep them stable. It is desirable to have formulations that do not require energy for storage and transport, therefore powder formulations would be the most appropriate to maintain stability until application at low cost. To achieve this, studies of the tolerance to desiccation of the bacteria of interest are required, so we need to know how to enhance the survival of beneficial bacteria under stress conditions. In this work, the general knowledge on the survival of *P. putida* KT2440 against environmental desiccation and lyophilization has been reviewed. Aspects, such as the increased survival by protecting compounds, the function of the bacterial membrane, as well as some key genes that could be involved in the tolerance to desiccation of this bacterium, were also covered.

**Keywords:** *Pseudomonas putida* KT2440; bacterial inoculants; desiccation; freeze drying; bacterial survival.

## INTRODUCCIÓN

Para aumentar la producción agrícola se han utilizado grandes cantidades de fertilizantes químicos, herbicidas, pesticidas entre otros compuestos tóxicos [1]. Este es un problema de dimensiones mundiales y en múltiples ocasiones se ha reportado [1]. México al igual que otros países del mundo ha adoptado estas prácticas y a continuación mostramos su panorama. De acuerdo con la FAO en el periodo de 2002 a 2011, la cantidad promedio de fertilizante nitrogenado adicionada en cultivos agrícolas de México fue de 893165.572 toneladas (t) para urea, 163647.711 t para fertilizantes tipo NPK, 8166.8733 t para el caso de nitrato de potasio y 134487.2 t para el nitrato de amonio (Tabla 1). La base de datos no cuenta

con información más actualizada, sin embargo, es altamente probable que el uso de estos insumos continúa siendo adicionado en forma intensiva. La adición de estos compuestos ha desequilibrado al medio ambiente y contaminado los suelos agrícolas [2]. Dentro de los problemas más ampliamente documentados está la eutrofización, la alta generación de compuestos NO<sub>x</sub> que al reaccionar con el agua de las nubes producen lluvia ácida y en el peor de los casos, si esos compuestos de tipo NO<sub>x</sub> llegan hasta la estratósfera, reaccionan con el ozono, debilitando la capa y siendo responsables en gran parte del cambio climático que en la actualidad se está viviendo [1,2]. Por otro lado, es ampliamente conocido que la adición de pesticidas y herbicidas también ha provocado un efecto nocivo sobre el medio

ambiente y los seres vivos [3–5]. Muchos de estos compuestos incluso son carcinogénicos y afectan gravemente a la salud humana [6–9].

Una alternativa para reducir la aplicación de estos compuestos recalcitrantes sin una disminución del rendimiento, es utilizar bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB; por sus siglas en inglés), estas bacterias interactúan con las plantas, promueven su crecimiento y algunas cepas tienen la capacidad de biorremediar compuestos tóxicos para el medio ambiente y el humano [10–13].

### Las PGPB e inoculantes para la agricultura

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal incluyen diversos géneros y de forma

natural colonizan en la rizósfera, nódulos radiculares, región aérea, entre otras estructuras de las plantas [14–17]. Estas bacterias resultan ser beneficiosas gracias a los mecanismos que ayudan en la salud y crecimiento de las plantas [18,19]. Los mecanismos implicados en la promoción del crecimiento vegetal se clasifican en directos e indirectos. En los mecanismos directos las bacterias permiten una mejor nutrición para las plantas, algunos ejemplos son la fijación biológica de nitrógeno, la producción de fitohormonas, la solubilización de fosfatos y la solubilización de zinc. Por otro lado, los mecanismos indirectos están involucrados en la protección de las plantas contra patógenos en donde encontramos; el biocontrol, la resistencia

**Tabla 1.** Tipos de fertilizante aplicados en los campos agrícolas de México y cantidad aplicada de 2002 a 2011.

Año	Tipo de fertilización nitrogenada (Toneladas)					
	Urea	NPK	Nitrato de potasio	Nitrato de amonio	Nitrato de amonio-cálcico*	Otros compuestos NP
2002	1260486	175239	22543	126093	419	189203
2003	1318771	176254	9406	86100	411	234545
2004	1351260	208290	5117	123245	275	164625
2005	1331519	199673	Nd	130074	20461	188114
2006	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
2007	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
2008	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
2009	1384773	104287	3144	68732	9683	143391
2010	1170527.21	174898.17	4252.01	177191.39	1083.87	110001.9
2011	1114319.51	106892.81	4539.23	229975.04	6913.84	190547.69
<b>Promedio</b>	893165.572	163647.711	8166.8733	134487.20	5606.67286	174346.799
<b>SD (+/-)</b>	605137.577	40106.4306	7022.3718	52364.064	7251.16024	38209.0922
<b>Incremento de 2002-2011</b>	0.8840395	0.6099829	0.2013587	1.8238525	16.5008114	1.0071071

Todos los datos fueron extraídos de la base de datos FAOSTAT (<http://www.fao.org/faostat/es/#data/RFB>). Nd = Dato no disponible. \*Nitrato de amonio cálcico (CAN) y otras mezclas con carbonato de calcio. N=Nitrógeno, P=Fósforo y K=Potasio.



sistémica inducida (ISR; por sus siglas en inglés), la resistencia sistémica adquirida (SAR; por sus siglas en inglés) y la producción de compuestos volátiles implicados en desencadenar respuesta de defensa en las plantas [18].

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal reducen la concentración de compuestos recalcitrantes y a su vez promueven el crecimiento de la planta [20–22]. Por esta razón, este tipo de bacterias podrían ser incorporadas como inoculantes bacterianos destinados a potenciar el rendimiento de cultivos agrícolas y a su vez, realizar la biorremediación de suelos contaminados por compuestos recalcitrantes adicionados en la forma de pesticidas herbicidas e incluso antibióticos [12,19,23].

En distintos países del mundo se han aprovechado los beneficios de las PGPB para formular inoculantes bacterianos conteniendo bacterias PGPB, estos han resultado amigables con el medio ambiente y estimulan el crecimiento de los cultivos agrícolas [24]. Uno de los principales países en donde se comercializan distintos tipos de formulaciones es la India [25,26]. En México aún falta más información sobre la utilidad, diseño, beneficios que tienen los inoculantes en la agricultura y su aplicación aún no está tan diseminada, sin embargo, algunos esfuerzos recientes han iniciado con el fin de informar a los agricultores sobre los beneficios y ya existe un mercado creciente de este tipo de formulaciones [27].

En la actualidad, muchas de las formulaciones disponibles en el mercado mexicano solo contienen un microorganismo; en los que destacan formulaciones hechas a base de *Azospirillum* sp. ó *Rhizobium* sp. [19]. Sin embargo, recientemente se han diseñado inoculantes, en donde se incorporan a más de una cepa bacteriana, todas con características PGPB, pretendiendo obtener un mayor beneficio en el crecimiento de la planta mediante un efecto de sinergismo [19,27]. Existen pocos estudios acerca de cómo ocurre el sinergismo entre varias cepas microbianas, o como ocurre la expresión de genes bajo co-interacción con las plantas, por lo que estos temas representan un reto para ser abordados en un futuro cercano [12]. Para obtener un inoculante con bacterias de tipo PGPB se requieren de distintos estudios como son adhesión bacteriana, colonización de raíces, demostrar que las cepas tengan la capacidad de promover el crecimiento de las plantas e incluso que tengan capacidades adicionales como un efecto de biocontrol contra patógenos o biorremediador de compuestos xenobióticos [28]. Es importante mencionar que se requiere realizar estudios de supervivencia de las bacterias bajo condiciones de estrés para seleccionar las más aptas a los diferentes escenarios donde serán aplicadas [23] y en el caso de inoculantes con más de una especie bacteriana se requieren también estudios de antagonismo para asegurar que las cepas son compatibles [26].

## Inoculantes monoespecie vs inoculantes con más de una cepa microbiana

Sin duda los inoculantes con una sola cepa microbiana han sido el punto de partida para comprender como podemos obtener beneficios de la interacción microorganismo-planta. Sin embargo, los inoculantes monoespecie no siempre son capaces de promover el crecimiento de las plantas y en muchas ocasiones fallan para lograrlo [18]; esto podría depender del tipo de especie, la variedad de la planta, las condiciones climatológicas, el tipo de suelos, entre otros factores. Se ha reportado que los inoculantes tienen mayor eficacia cuando existe más de una bacteria benéfica. Entre los años 2010 a 2020 se han publicado estudios que demuestran que la coinoculación de dos o más cepas es mejor que la mono-inoculación [29,30]. Por ejemplo, existe un excelente sinergismo entre *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 y el agente de biocontrol *Bacillus* sp. CHEP5, donde la inoculación de ambas cepas incrementan el peso seco de nódulos, así como el porcentaje de nitrógeno de *Arachis hypogaea* L. (maní), además aumenta la defensa contra patógenos [31]. Por otro lado, las rizobacterias *Bacillus subtilis* 189 y *Pseudomonas fluorescens* RB4 fueron coinoculadas para intensificar la absorción y la fitorremediación en *Catharanthus roseus* en suelos contaminados con metales, obteniendo una mayor captación de nutrientes, mejora la absorción de metales y hay un aumento de biomasa [32]. *Methylobacterium oryzae* CBMB20 con *Azospirillum brasilense* CW903 ó *Burkholderia pyrrocinia* CBPB-HOD

coinoculadas en diferentes tipos de plantas incrementaron la longitud de los brotes, la absorción de nutrientes y el aumento de ciertas enzimas [33]. La coinoculación de cepas *Pseudomonas fluorescentes* y *Rhizobium* mejoraron el crecimiento de plantas, además de aumentar la actividad antifúngica contra patógenos [34]. *Mesorhizobium ciceri* en conjunto con rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR; por sus siglas en inglés) con actividad ACC-desaminasa (*Serratia marcescens* (SF3) y *Serratia* sp. (ST9), aumentaron el rendimiento del fruto y el contenido de clorofila en cultivos de *Cicer arietinum* (Garbanzo) [35].

Recientemente se han diseñado inoculantes multiespecies en donde se incorporan a más de una cepa bacteriana principalmente de características PGPB y existe sinergismo entre ellas [19,36,37]. Estas formulaciones están resultando muy útiles para estimular el crecimiento de plantas a pesar de las variaciones en las condiciones ambientales y se han denominado inoculantes de segunda generación [12,27,36,38]. Para el diseño y desarrollo de inoculantes de segunda generación se deben de realizar estudios adicionales a los realizados para el diseño de inoculantes que contienen una sola especie, para así garantizar la eficacia en referencia a los mono-inoculantes [27]. Se debe asegurar compatibilidad entre cepas, se hacen estudios para explorar la tolerancia de las cepas a condiciones de estrés como la desecación y se demuestra su efectividad en conjunto para la promoción de crecimiento de plantas. Para

estos estudios se debe de contar con medios de cultivo de selección de cada cepa que forma parte de una mezcla bacteriana, así como métodos moleculares para la corroboración de la cepa estudiada cuando se encuentra cointeraccionando con las otras especies bacterianas [26,27,36]. En la actualidad las formulaciones de segunda generación se comercializan en presentaciones líquidas y se requiere refrigeración para su resguardo, por lo que los costos de almacenamiento y transporte incrementan los costos del producto final [27]. Será deseable contar con formulaciones en polvo estables que eviten ese gasto energético, para ello se requiere realizar estudios de desecación de las bacterias de interés y saber cómo podemos incrementar su supervivencia ante la limitación de agua.

### **La supervivencia microbiana y efectividad de los inoculantes**

La supervivencia de los microorganismos es clave para el éxito de los inoculantes bacterianos. Comúnmente los inoculantes bacterianos contienen un acarreador para proteger a las células bacterianas de interés de las adversidades que sufren desde su producción hasta su aplicación en el campo [39–41]. Otro aspecto es que los microorganismos deben de mantenerse en una cierta concentración, comúnmente por arriba de un millón de bacterias por gramo de suelo para mantener la efectividad [42]. Sin embargo, durante el almacenamiento las bacterias sufren una disminución en el número de células en

función del tipo de acarreador y las condiciones de temperatura [43]. Para el caso de formulaciones en turba y en polvo, esta disminución podría ser debida a la baja disponibilidad de agua [44,45]. Por otro lado, después de la inoculación de semillas con bacterias de tipo PGPB, se puede ocasionar un nuevo descenso en el número de bacterias si ocurre un estrés hídrico en el suelo [23,46,47]. La escasez de agua en los campos agrícolas en ciertos periodos del año, son eventos cada vez más frecuentes y afectan fuertemente a los cultivos [48,49]. Los eventos de disminución o incremento de lluvias han sido relacionados con el cambio climático [50]. Esto ha traído como consecuencia que los cultivos de temporada se vean afectados por la escasez de precipitaciones o por exceso de ellas [49,51]. En el caso de semillas inoculadas, es importante que los microorganismos que integran a un inoculante deben tener la capacidad para adaptarse a las diferentes condiciones donde son cultivadas [23,46], como son salinidad, eventos de sequía, la fisiología de la planta, asimismo deberán tener sinergia con el tipo de cultivo donde serán utilizados y la formulación que contiene estos microorganismos deberá ser de fácil aplicación [39,40].

### **Importancia de la desecación en bacterias benéficas**

El agua es fundamental para el desarrollo de cualquier ser vivo y la desecación afecta fuertemente a la supervivencia [52,53]. La desecación es la pérdida de agua de las células

hasta el equilibrio con el agua presente en el entorno, una desecación extrema ocurre a 30 °C y 50% de Humedad Relativa (HR) [23,36]; condición en la cual se pierde agua hasta alcanzar 0.1 g de agua por gramo de masa seca [54]. Durante la desecación el metabolismo celular disminuye hasta que se detiene [55] y solo las células de organismos anhidrobiontes recuperan sus funciones fisiológicas tras la rehidratación [23,54].

Durante la desecación las bacterias PGPB sensibles disminuyen su viabilidad, debido entre otras cosas a la acumulación de sales, provocando estrés osmótico, hay daño a nivel de membrana, ADN, proteínas, entre otros [55–58]. Las células desecadas que no son tolerantes no podrán ejercer sus funciones benéficas tras la rehidratación [23]. Elaborar formulaciones estables y eficaces que sobrepasen las distintas condiciones adversas como la baja disponibilidad de agua ha sido un reto de los últimos años [23,36]. Sin embargo, pocas formulaciones de inoculantes que contienen bacterias tolerantes a la desecación han sido desarrollados [36,59].

### **Ensayos para estudiar la tolerancia a la desecación en bacterias**

Para comprender la tolerancia a la desecación de bacterias tipo PGPR, se han llevado a cabo estudios bajo condiciones extremas donde se provoca la pérdida de agua [23,55,60]. Dos tipos de ensayos se destacan para estudiar la tolerancia de las bacterias a la desecación: 1) ensayos de desecación ambiental controlada y

2) ensayos de desecación por liofilización [23,61]. En ambos experimentos las células bacterianas son centrifugadas tras su crecimiento y el sedimento celular es resuspendido en agua o en una solución protectora, las muestras se pueden dispensar en tubos eppendorf de 1.5 µL con 500 µL de volumen inicial y cada tubo es cubierto por un tapón de algodón que permite la evaporación de agua. A continuación, se describen las condiciones de ambos métodos y sus alcances.

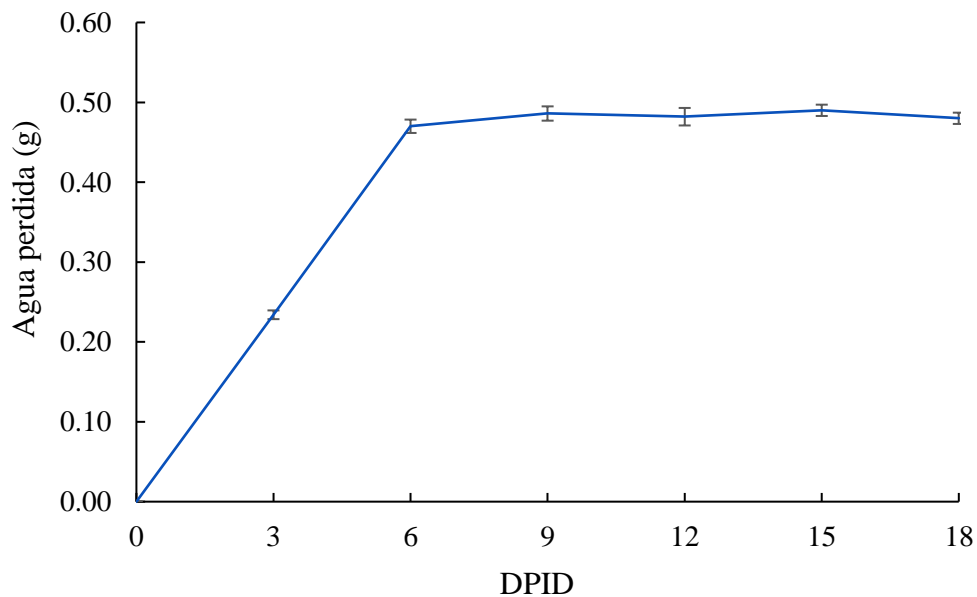
### **Condiciones de desecación ambiental y niveles de tolerancia**

Las condiciones de desecación ambiental controlada comúnmente ocurren a 30 °C y 50% de humedad relativa a una presión de aproximadamente 1 atmósfera [23,62]. Las cuantificaciones del número de bacterias se realizan antes de la desecación y comúnmente cada 3 días posteriores al inicio de la desecación (DPID) hasta los 18 DPID. Las muestras alcanzan su máxima pérdida de agua entre el quinto y sexto día después del inicio de la desecación (Figura 1). Este método de desecación se ha utilizado principalmente para conocer la capacidad de tolerancia a la desecación de bacterias benéficas, por lo que los resultados pueden identificar a las más tolerantes bajo condiciones muy similares a las condiciones que sufrirán en los campos agrícolas [23]. Sin embargo, son estudios que requieren de una inversión alta de tiempo. Para una comparación rápida entre el número de bacterias que sobrevive después de la

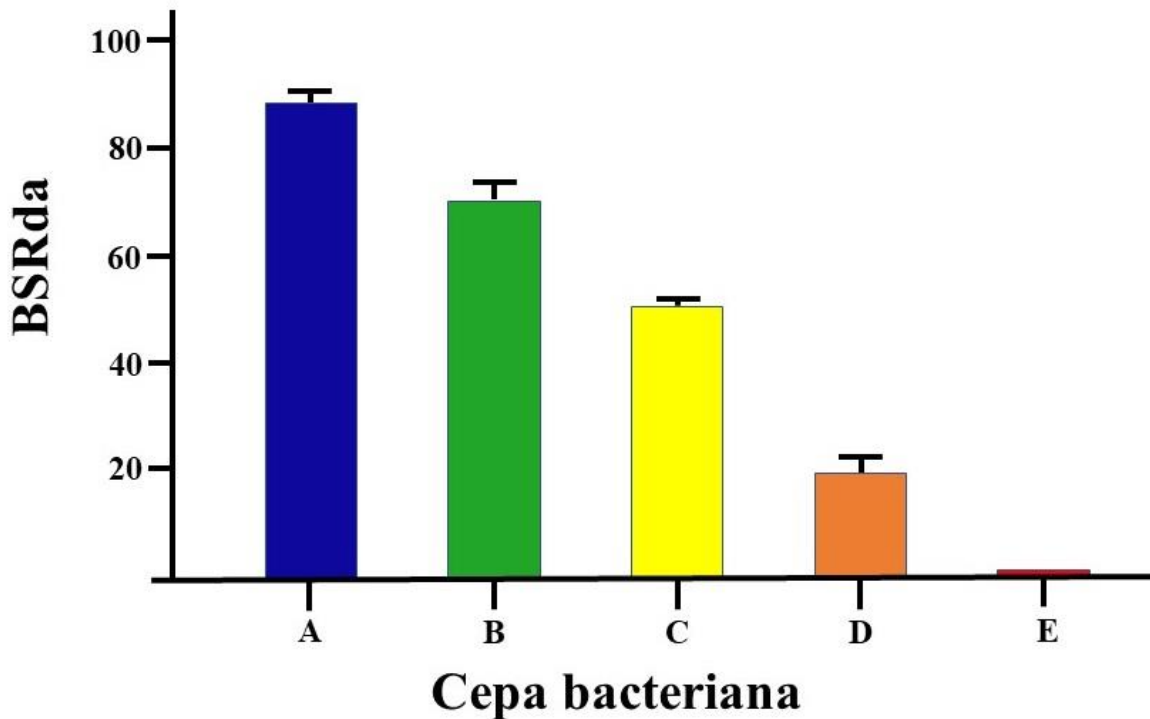
deseccación con relación al número de bacterias iniciales (antes de la desecación) se ha propuesto un concepto denominado tasa de supervivencia bacteriana (BSR de sus siglas en inglés “Bacterial Survival Ratio”) [36,60,61,63]. La BSR se define como la relación del número Log de bacterias después de la desecación (log PD) más 1 entre el número Log de bacterias antes de la desecación (log BD), cuyo resultado se multiplica por 100;  $BSR = [(\log PD + 1)/\log BD] \times 100$  [62].

En función de la tolerancia a la desecación ambiental, se han propuesto 5 niveles de supervivencia bacteriana, los cuales se han designado por colores para una visualización

rápida (Figura 2): bacterias altamente tolerantes ( $BSRad > 80$ ) (azul), bacterias tolerantes ( $60 < BSRad \leq 80$ ) (verde), bacterias de mediana tolerancia ( $40 < BSRad \leq 60$ ) (amarillo limón), bacterias de tolerancia baja ( $20 < BSRad \leq 40$ ) (amarillo oscuro) y bacterias de muy baja tolerancia a la desecación ( $BSRad \leq 20$ ) (rojo) [23]. Las bacterias altamente tolerantes a la desecación son adecuadas para desarrollar formulaciones estables que puedan adaptarse y tolerar la pérdida de agua. Además, se podrían diseñar formulaciones en polvo debido a su fácil manejo y transporte al campo. Al momento de rehidratar a las células, sus características podrán aprovechar sus beneficios en el sitio agrícola de aplicación.



**Figura 1.** Pérdida de agua en ensayos de desecación para *P. putida* KT2440. Los valores se calcularon al restar el peso de los tubos Eppendorf después de la desecación al peso de los tubos antes de la desecación. Los ensayos de desecación fueron realizados a 30°C y 50% de humedad relativa. Cada punto representa la media de 5 determinaciones con su respectiva desviación estándar. DPID significa días posteriores al inicio de la desecación. Es importante resaltar que aunque no está graficado aquí, en el tiempo 5 DPID se registró un dato cercano al valor máximo de pérdida de agua [23].



**Figura 2.** Ejemplos de bacterias con distintos niveles de tolerancia a la desecación ambiental (BSRda=Supervivencia bacteriana a la desecación ambiental en presencia de aire); la desecación ocurrió a 30 °C y 50 % de humedad relativa. (A) *Enterobacter* sp. UAPS03001 (BSR=84.33 ±1.88); (B) *Azospirillum brasilense* Sp7 (BSR=75.11 ±3.56); (C) *Paraburkholderia tropica* Ppe8 (BSR= 51.21 ±0.82); (D) *Klebsiella* sp. T19A (BSR= 20.0 ± 3.5); (E) *Pseudomonas putida* KT2440 (BSR=0). Los datos fueron tomados de Pazos-Rojas y cols. (2018) [23].

Entre las bacterias altamente tolerantes a la desecación en aire destacan *Azospirillum halopreferans*, *Burkholderia unamae* MTI-641, *Burkholderia tropica* MTo-293 y *Enterobacter* sp. UAPS03001 [23,26].

### Desecación por liofilización y la preservación de bacterias

El proceso de liofilización tiene como finalidad la preservación de las muestras, facilita el transporte y reduce el espacio de almacenamiento, sin que se afecten sus características originales. El proceso de liofilización es específico para cada muestra y

para obtener óptimos resultados se deben de caracterizar las condiciones y a los protectores adecuados [64,65]. Es definido como un método estable que deseca la muestra bajo condiciones de vacío [66].

La desecación mediante liofilización se diferencia fuertemente de la que ocurre en la desecación ambiental, ya que 3 formas de estrés están implicadas en el proceso [64,67,68]. Primero las muestras son sometidas a congelación, donde la muestra toma una forma de cristal, este paso es crucial para el producto liofilizado. Después, las muestras congeladas se colocan en el liofilizador donde éstas sufren un

vacío hasta 20 mTorr o menos, una condición que se aproxima al vacío absoluto. Esto implica que las células sufren un descenso de presión de aproximadamente 1 atm. Bajo estas condiciones el agua congelada pasa de un estado sólido-congelado a un estado gaseoso (sublimación), esta etapa se conoce como el secado primario; donde aproximadamente entre el 70 y 90 % de agua se evapora en condiciones de vacío. Posteriormente, el secado secundario o desorción en donde se elimina entre el 5 al 10% de humedad restante en la muestra [66]. Las células de la muestra quedan como polvo y el agua evaporada es capturada en una trampa que se encuentra a -80 °C. Después de aproximadamente 24 horas las muestras con las células desecadas son sacadas del liofilizador, para ello, de forma gradual se rompe el vacío para retornar a 1 atmósfera de presión (760 Torr). Esto implica que para el proceso de liofilización las células sufren congelación, desecación y dos cambios de presión. Las cuantificaciones del número de bacterias se realizan antes de la liofilización, después de la liofilización y días posteriores a la liofilización, para determinar la supervivencia bacteriana [67,69,70].

En la liofilización debido a la deshidratación de las muestras, éstas pueden sufrir daño, por ejemplo, en muestras biológicas las proteínas pueden desnaturalizarse, afectando la supervivencia bacteriana [69], es por ello que se requiere de protectores, que tienen como finalidad proteger a la muestra de los distintos tipos de estrés que las células sufren durante el proceso. Estos protectores pueden ser de

diferente naturaleza química por ejemplo polioles, disacáridos, aminoácidos entre otros [70].

La liofilización en el área de microbiología se ha utilizado principalmente para el almacenamiento y preservación a largo plazo de cepas microbianas, lo que permite mantener una alta viabilidad y supervivencia [57,70]. Este método es útil para el almacenamiento hasta por 50 años de algunas bacterias, sin embargo, las condiciones o protectores dependerán del microorganismo liofilizado [71]. Esta técnica se ha utilizado como una herramienta sencilla y rentable para mejorar y disminuir la contaminación de probióticos o suplementos alimenticios, que tienen como base a bacterias ácido lácticas. En un estudio, *Lactobacillus plantarum* fue sometida a dos procesos de desecación, la liofilización y secado por aspersion, la liofilización resultó ser más eficiente y permitió una mayor supervivencia y estabilidad bacteriana; siendo los disacáridos no reductores los mejores protectores [72].

El uso de protectores como la trehalosa, la sacarosa y el myo-inositol han sido ampliamente utilizados en el proceso de liofilización bacteriana [61,64,70]. Sin embargo, no existe un protector universal y hay aún pocos estudios de la supervivencia de bacterias a este proceso en comparación con la gran diversidad bacteriana descrita [70]. Algunos ejemplos de bacterias estudiadas en este proceso incluyen a *Pseudomonas putida* KT2440 [61], *Escherichia coli* [69], *Azotobacter vinelandi* [60]. Para propósitos de

preservación bacteriana, las células liofilizadas son resguardadas al vacío en liófilos para conservarlas por largo tiempo. Una vez que se procede a realizar el rescate celular, los liófilos tienen que ser abiertos, por lo que el vacío se rompe abruptamente, lo que daña fuertemente a las células, especialmente las de microorganismos sensibles al oxígeno; consecuentemente disminuyendo el número de células viables [68]. Para propósitos de preservación esto no tiene mayor importancia, ya que, con ese número bajo de células viables, se puede reiniciar su crecimiento y rescate. Sin embargo, para formulaciones que contienen microorganismos destinados para la agricultura, un número bajo de células viables puede conducir a una baja eficacia de los inoculantes [42]. No obstante, la liofilización representa una forma rápida de obtener células bacterianas en polvo y podría significar una forma importante para el diseño de formulaciones microbianas en polvo que podrían ser aplicadas en los campos agrícolas después de que las células sean hidratadas en el sitio donde serán aplicadas. Por esta razón, se siguen realizando investigaciones con el fin de conocer cómo se puede aumentar la supervivencia de las células a este proceso [73–75].

### ***P. putida* KT2440, una bacteria con varias potencialidades**

*P. putida* KT2440 proviene de la cepa PWWO [36,76]. A diferencia de la cepa PWWO la cepa KT2440 no contiene el plásmido TOL el cual es

responsable de la degradación de tolueno [77]. Sin embargo, la cepa KT2440 mantiene la capacidad de degradar compuestos recalcitrantes como el ácido nicotínico y los ácidos nafténicos, además de usar como fuente de carbono a compuestos aromáticos y se adhiere eficazmente a superficies abióticas y bióticas [78]. *P. putida* KT2440 es una bacteria Gram-negativa, es saprofita, debido a su versatilidad y adaptabilidad metabólica puede sobrevivir en distintos ambientes, utilizando diferentes sustratos [79]. Esta bacteria está certificada como una cepa biosegura para clonación de genes externos, la secuencia de su genoma tiene una longitud de 6181863 pb [76,80,81]. Asimismo, posee un potencial para uso en la biorremediación, biocatalisis, como agente de biocontrol y producción de bioplásticos [81,82]. *P. putida* KT2440 es excelente colonizador de la rizósfera de distintas plantas de cultivo, además promueve su crecimiento y salud [36,81,83]. Esta cepa es capaz de desencadenar una respuesta de defensa en plantas ejerciendo una protección contra microorganismos patógenos [84,85]. Interesantemente, la bacteria promueve el crecimiento de las plantas en condiciones adversas de salinidad y de elevadas temperaturas [83]. Lo que ha permitido que esta bacteria sea útil en la generación de inoculantes multiespecies de segunda generación por su compatibilidad con otras cepas y su capacidad de generar efectos benéficos en consorcio [26,36,59,86].

A pesar de sus características benéficas *P. putida* KT2440 presenta dificultades para

tolerar procesos de desecación, tanto bajo condiciones de liofilización [61,87], como en condiciones de desecación ambiental [23,62]. Esto significa que si ocurre una sequía en alguna fase previa a la colonización; por ejemplo durante el almacenamiento del inoculante, o después de la aplicación en semillas, la supervivencia de la bacteria declina, siendo esto una limitante para ejercer sus beneficios [61,87]. Las razones de esta aparente sensibilidad es multifactorial, por ejemplo, ocurren cambios mecánicos, estructurales y metabólicos debido a la disminución de agua y que afectan de forma severa a la integridad de la membrana, ADN y proteínas [47]. Bajo condiciones de desecación, las bacterias sobrevivientes responden al estrés, aumentando la producción de polisacáridos, cambiando la composición de las membranas, incrementando la estabilidad de proteínas, disminuyendo el estrés oxidativo y reparando el ADN dañado [47,58,61,88]. Sin embargo, el conocimiento respecto a la respuesta de *P. putida* KT2440 aún es mínimo cuando esta bacteria es desecada [62,88]. Es importante destacar que la supervivencia a la desecación de esta bacteria es mayor en fase estacionaria respecto de la fase exponencial, posiblemente debido a que las células cambian su composición de fosfolípidos de sus membranas capacitándolas para tolerar la pérdida de agua [61].

### ***P. putida* KT2440 entra en un estado viable no cultivable durante la desecación**

Las células bacterianas que experimentan

desecación muestran daño en sus membranas [47], se vuelven susceptibles a las especies reactivas de oxígeno (ROS) [89], metabólicamente no están activas y no reparan los daños [55]. Las proteínas y el ADN sufren cambios en su conformación y daño estructural [47,90]; provocando estrés celular y en consecuencia ocurre la muerte celular en bacterias sensibles. Las bacterias tolerantes poseen mecanismos para contrarrestar todos estos daños, por ejemplo, pueden formar biofilms, acumular trehalosa, producir moléculas antioxidantes, formar esporas, entre otros [52,91].

Las rizobacterias altamente tolerantes a la desecación no reducen sus capacidades de adhesión, colonización y promoción del crecimiento, tras la rehidratación [92]. Ejemplo de estas bacterias, incluyen a miembros de las cepas *Azospirillum halopreferans*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5, *Paraburkholderia unamae* MTI-641, entre otras [23,36]. Por el contrario también existen PGPB sensibles a la desecación en donde tras la rehidratación, no son capaces de colonizar la rizósfera de las plantas y mucho menos promueven su crecimiento; tal es caso de *Burkholderia sacchari* [23].

Una de las limitantes más fuertes para la efectividad de un inoculante es la capacidad de las bacterias para resistir a la desecación [23,93]. Las bacterias sensibles pueden morir tras la inoculación de semillas, si después del sembrado no hay agua y ocurre una desecación [47]. De hecho, *Bradyrhizobium japonicum* muere en cuestión de horas tras la pérdida de

agua [23,46]. Interesantemente, *P. putida* KT2440 ha sido utilizada en el diseño de formulaciones destinadas para mejorar el crecimiento de plantas de maíz y biznaga, donde en conjunto con otras cepas bacterianas tolerantes a la desecación, potencian el desarrollo de las plantas, a pesar de que las células bacterianas fueron sometidas previamente a estrés por desecación [36,59].

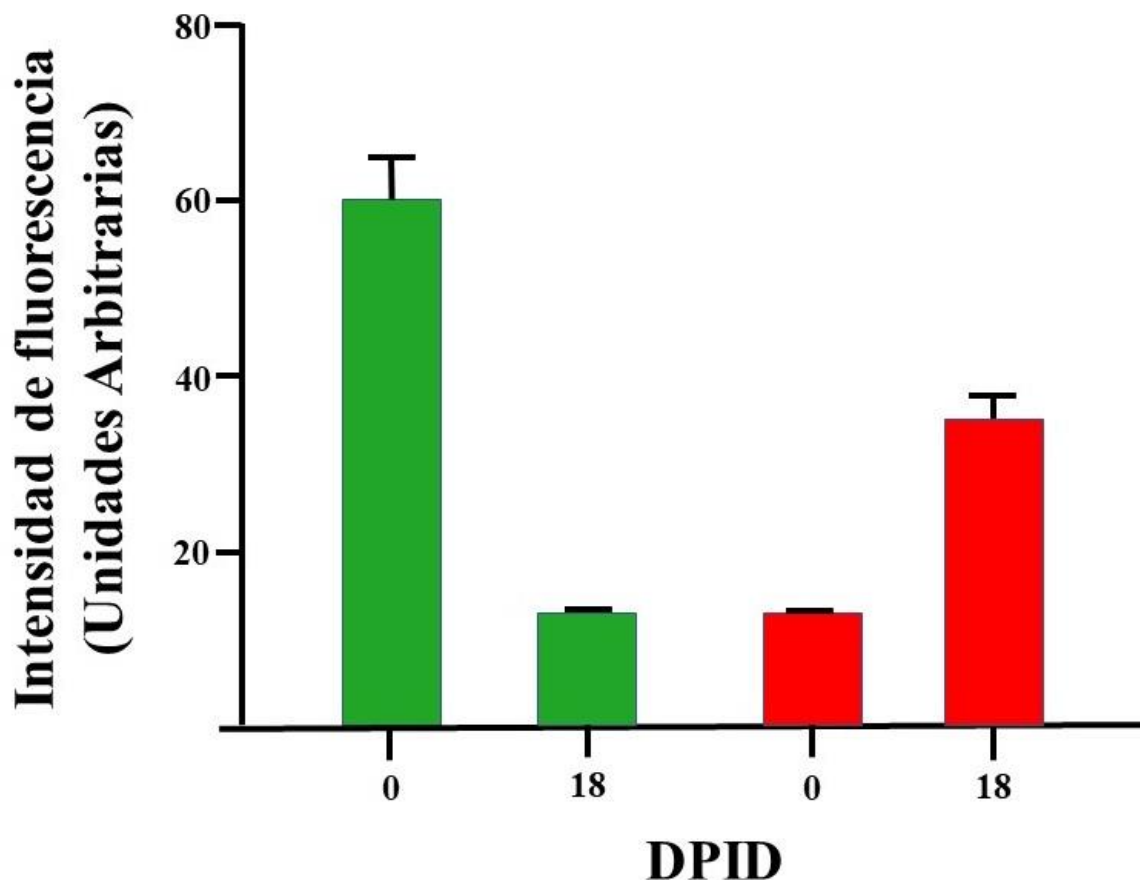
Cuando se sometió a *P. putida* KT2440 a una desecación al aire a 30 °C y 50% de Humedad Relativa (HR) en presencia de diferentes protectores (concentración de 200 mM), se observó que los disacáridos no reductores protegen a la bacteria de la desecación ambiental aun a los 18 DPID [62]. La trehalosa fue el mejor protector y permitió el aumento de la cultivabilidad de la cepa bacteriana de una BSR de 0 (sin protector) a una BSR de 90 (con protector). Cabe destacar que la concentración de este disacárido podría ser clave para conseguir esta protección, como ha sido observado bajo condiciones de liofilización [61]. La trehalosa a una concentración de 200 mM también protege a *P. putida* KT2440 de los tres tipos de estrés causados en liofilización [61]. Sin embargo, en liofilización se desconoce como ocurre la supervivencia de las células cuando estas se resguardan en condiciones de 1 atm de presión y en presencia de aire, en lugar de condiciones de vacío usadas durante la preservación de liófilos [57,70]. Los disacáridos como la trehalosa, aparentemente son capaces de proteger a las membranas de la desecación mediante la sustitución de moléculas de agua [52]. Los disacáridos

sustituyen los puentes de hidrógeno del agua, permitiendo que la membrana mantenga su fase de cristal fluida [69]. Sin embargo, los disacáridos también protegen a las proteínas y al ADN de forma directa [94,95].

Las células de *P. putida* KT2440, aparentemente son sensibles a la desecación ambiental cuando se desecan en presencia de aire, durante 18 días, a 1 atm de presión, 30 °C y 50% HR y sin uso de protector [23]. Sin embargo, la bacteria regresa de forma rápida a un estado cultivable cuando interactúan con exudados de raíces de maíz, o tras una rehidratación prolongada (48 h) [62]. Lo que sugiere que la bacteria entra en un estado viable pero no cultivable. Una de las metodologías ampliamente usadas para demostrar el estado viable no cultivable es el “LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit” acoplado a la observación microscópica de fluorescencia [96], que se complementan con ensayos de RTqPCR para evaluar expresión de genes [96–98]. Usando el método “LIVE/DEAD” las células viables que poseen una membrana intacta se tiñen de verde y las células con membrana dañada se tiñen de rojo [99], por lo que se generaliza que las bacterias con membranas dañadas están muertas [100]. Cuando las células desecadas (durante 18 días) de *P. putida* KT2440 son rehidratadas, estas se tiñen de rojo [62]; lo que implicaría que ellas están muertas. Sin embargo, estas células retornan al estado cultivable tras una rehidratación prolongada o de forma rápida en presencia de exudados, y una vez que han regresado a este estado, las membranas

incrementan la intensidad de color verde [62]; lo cual es visualizado de forma clara mediante un análisis de intensidad de fluorescencia (Figura 3). Por lo que se cuestiona si las bacterias mueren durante la desecación y resucitan tras la rehidratación o solo entran en un estado viable no cultivable por los daños ocasionados por la desecación y que esos daños sobre la membrana son subletales [62,101]. Este cuestionamiento no ha podido ser respondido, no obstante, se ha aceptado que *P. putida* KT2440 es capaz de entrar en un estado viable no cultivable (VBNC) durante la desecación ambiental y que las bacterias

reparan la membrana celular antes de poder ser nuevamente cultivables [62]. Independientemente de si es un estado VBNC o si ellas resucitan, esta bacteria tolera a la desecación; entrando en un estado de dormancia o tal vez de muerte [62,101]. *P. putida* KT2440 activa sus actividades metabólicas, reparación de membrana y transcripción de genes clave tras la rehidratación prolongada [62], pero aún falta trabajo que aclare como es que la activación de transcripción y del metabolismo permiten que la bacteria retorne a un estado cultivable.



**Figura 3.** Intensidad de fluorescencia promedio de células teñidas con el “LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit”. Datos tomados de Pazos-Rojas y cols., (2019) [62]. En verde se muestra el análisis de SITO 9 y en rojo el análisis de yoduro de propidio. DPID significa días posteriores al inicio de la desecación.

### **El C17:ciclopropano podría preparar a *P. putida* KT2440 para tolerar a la desecación**

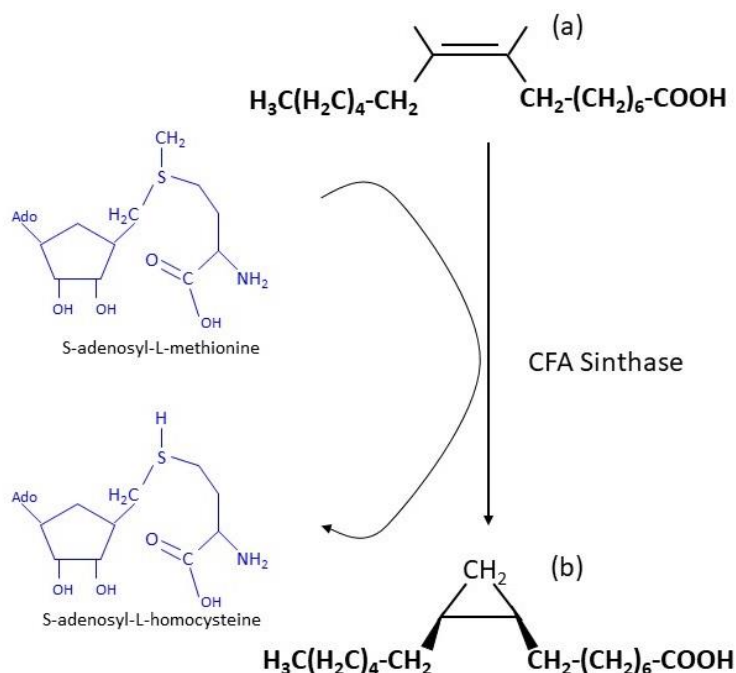
La membrana es la barrera principal de una bacteria para defenderse de cualquier tipo de estrés [102]. Las membranas bacterianas constituyen el primer punto de contacto entre los microorganismos y el medio ambiente, por lo que las bacterias han desarrollado diversos mecanismos para defenderse de la acción de diferentes agentes perturbadores, como cambios de temperatura o pH, y productos químicos nocivos [103]. Por esta razón, los estudios sobre lo que ocurre a la membrana durante la desecación de *P. putida* KT2440 y como ésta puede ser reparada es de gran interés, ya que podría aportarnos conocimiento de cómo se pueden inducir estos cambios en otras bacterias de interés biotecnológico, para la preparación de formulaciones en polvo estables.

La capacidad de alterar la composición de lípidos de la membrana, es fundamental para la supervivencia y adaptación bacteriana en respuesta al estrés ambiental [104]. En la desecación existe un daño a la membrana plasmática, en donde los lípidos pasan a una fase de gel, que desencadena una mayor rigidez de la membrana [47,61,69]. En *P. putida* KT2440 se ha demostrado que cuando las células tienen un nivel de C17:ciclopropano elevado, éstas son más tolerantes a la desecación por liofilización y las mutantes defectivas en el gen *cfab* ya no son tolerantes a la desecación por liofilización [61]. El gen *cfab* codifica para una ciclopropano sintasa que es capaz de transformar el C16:cys en

C17:ciclopropano, usando S-adenosil metionina como donador de grupos metilo (Figura 4). Por esta razón las mutantes defectivas en este gen casi no producen C17:ciclopropano. Será interesante en un futuro evaluar si bajo condiciones de desecación ambiental, el C17:ciclopropano incrementa en *P. putida* KT2440; aportando una adaptación a las condiciones de baja disponibilidad de agua.

### **Transcriptómica de *P. putida* KT2440 bajo condiciones de limitación de agua**

Los estudios globales de expresión de genes son muy importantes para poder comprender cuales de ellos podrían estar implicados en una función de interés [105]. Por ejemplo, si estamos buscando genes de una bacteria que se expresan en condiciones de salinidad, esta bacteria se crecerá en dos condiciones: sin estrés salino y en alta salinidad. Se extraerá ARN de las bacterias que crecieron en ambas condiciones y se estudiará la diferencia que existe en la cantidad de transcritos en una condición respecto de la otra. Es importante señalar que en estos estudios se designa un número de corte para validar si existe una diferencia en la expresión; ese número en términos generales corresponde a la cantidad de veces más o veces menos que un transcrito es expresado. Existen algunos problemas relacionados con estos estudios [106], siendo el límite de corte de la expresión uno de los principales; ya que se pueden descartar genes que se expresan por debajo del corte asignado, pero cuya expresión es suficiente para



**Figura 4.** Transformación del C16:Cis a C17:ciclopropano por la enzima CFA sintasa.

desencadenar una función [105]. No obstante, estos estudios son un acercamiento bastante acertado para conocer a los genes implicados en un proceso biológico. La expresión de los genes de mayor interés, obtenido en estudios de expresión global, se tiene que confirmar mediante estudios más finos de expresión; como el método de RTqPCR [107,108] o RTPCR [109]. Lo más interesante de estos estudios es armar el rompecabezas para entender como unir la expresión de los genes con el modelo biológico en estudio.

Hay diversas maneras en los que se pueden realizar los estudios globales de expresión de genes [110]. Sin embargo, dos metodologías se usan ampliamente: 1) estudios de expresión de genes mediante microarreglos [111,112], 2) estudios de expresión de genes a través de la metodología RNA seq [113,114]; siendo la

segunda metodología más ampliamente usada en nuestros días [110], debido a la evolución de la secuenciación masiva, porque los resultados son de mayor sensibilidad, es altamente reproducible, no se requiere conocimiento previo de los genes a estudiar, los costos son cada vez menores [105,110]. Otra forma de estudiar genes implicados en un proceso biológico de forma global, es mediante mutagénesis con minitransposones portando genes reporteros y estudiando la expresión de esos genes reporteros [88].

En *P. putida* se han realizado algunos estudios de expresión de genes bajo condiciones de limitación de agua y bajo condiciones de desecación [88,101,115,116]. Por ejemplo, en *P. putida* LH0001, se identificaron los genes que están controlados por estrés hídrico y para generar mutantes defectuosos en la tolerancia a

la desecación, se realizó la construcción de una librería por mutagénesis al azar con el uso del mini-Tn5-pho A [88]. Se identificaron 20 genes que fueron inducidos por un estrés hídrico, pero no por un estrés osmótico provocado por polietilén glicol (PEG); termodinámicamente equivalente. Once genes fueron inducidos por ambos tipos de estrés, tres genes fueron inducidos por un estrés osmótico y tres genes fueron reprimidos por un estrés hídrico. Veintiséis genes fueron homólogos a las secuencias presentes en la secuencia completa del genoma de *P. putida* KT2440 o la secuencia del plásmido pWVO que participan en el destino de las proteínas, la adquisición de nutrientes o solutos, la generación de energía, la motilidad, la biosíntesis de alginato o la estructura de la envoltura celular, y la función de cinco no se pudieron predecir a partir de la secuencia. Estos datos proporcionan una visión global del entorno que perciben las bacterias en los hábitats de bajo contenido de agua y sugieren que los mecanismos de adaptación para el crecimiento en hábitats de bajo contenido de agua son diferentes de los del crecimiento en hábitats de alta osmolaridad.

El alginato, es un exopolisacárido (EPS) producido por *P. putida* [117], este EPS crea ambientes hidratados y alivia el efecto de la limitación del agua [118]. En un estudio transcriptómico de *P. putida* KT2440 bajo condiciones de limitación de agua se observó una expresión transitoria de genes de síntesis de alginato de KT2440. Los genes de síntesis de alginato fueron sobreexpresados tras las 4 h de estrés, pero disminuían sus niveles de expresión

con un estrés prolongado [116]. Estos hallazgos apoyan el papel del alginato como un EPS importante bajo limitación de agua para esta bacteria. *P. putida* también es capaz de producir otros EPS como la celulosa, exopolisacárido a y exopolisacárido b [81,119]. La función de los EPS bajo una leve limitación de agua fue estudiada; usando un modelo de superficie porosa presurizada [120]; creando condiciones limitadas de agua parecidas a lo que ocurre en el suelo. Las morfologías de las colonias y los transcriptomas del genoma completo de *P. putida* KT2440 de tipo silvestre y sus mutantes deficientes en la síntesis de alginato o de otros EPS conocidos fueron considerados. En general, los resultados mostraron que el alginato es un exopolisacárido importante bajo limitación de agua y en ausencia de alginato se activan otros mecanismos de tolerancia; como los genes relacionados con el estrés oxidativo, genes relacionados con la integridad de la membrana, genes que codifican para proteínas de choque térmico y proteínas de estrés universales, entre otros [115].

En un estudio reciente de microarreglos cuando *P. putida* KT2440 entra en estado VBNC tras la desecación, se observó que se activan los receptores dependientes de TonB asociados a el transporte de sideróforos de hierro y después de la rehidratación se activan procesos catabólicos de fenilalanina/tirosina para la síntesis de ubiquinona [101].

La rehidratación activó en un principio a 6 genes que fueron sobreexpresados (estado VBNC). Sin embargo, la respuesta principal se detectó después de 24 h de rehidratación con

148 genes regulados positivamente y 42 regulados negativamente (estado cultivable) [101]. Durante el estado VBNC, *P. putida* activó procesos de transporte transmembrana como el de los sideróforos a través de un transportador dependiente de TonB y sistemas de transporte de alcohol polihídrico putativo. La rehidratación prolongada con agua destilada resucitó las células de *P. putida* KT2440 activando el catabolismo de fenilalanina / tirosina para proporcionar energía y carbono para la biosíntesis de ubiquinona, mientras se mantiene una síntesis de proteínas reducida. Por otro lado, la interrupción del gen del receptor dependiente de TonB (PP\_1446) provocó un incremento en la supervivencia a la desecación de la cepa mutante. La activación del sistema de transporte de hierro (receptor de sideróforo dependiente de TonB) y el transporte de alcohol podrían ayudar a mantener un estado VBNC de *P. putida* KT2440. Posiblemente la activación del catabolismo de fenilalanina / tirosina y la síntesis de proteínas reducida, son requeridas por la bacteria para su reanimación del estado de VBNC [101].

Los estudios transcriptómicos en condiciones de desecación han sido desarrollados en condiciones diferentes y podríamos suponer que son fotos que describen la expresión global de los genes participantes en el instante de tiempo estudiado. Es por ello, que aún se requiere un mayor esfuerzo para comprender que genes se deben expresar para permitir a *P. putida* KT2440 tolerar a la desecación y cuáles son los determinantes principales para obtener formulaciones en polvo más estables.

## CONCLUSIONES

El uso de fertilizantes nitrogenados y otros productos de la revolución verde ha traído graves consecuencias al ambiente, es urgente cambiar las prácticas agrícolas para evitar este tipo de insumos. Las bacterias promotoras del crecimiento de plantas podrían ser una excelente alternativa para mantener los rendimientos elevados disminuyendo el uso de fertilizantes. Se han estudiado varias bacterias con potencial promotor de crecimiento, una de ellas es *P. putida* KT2440; una bacteria benéfica que tiene la capacidad de biorremediar el suelo y promover el crecimiento de plantas con las que se asocia, especialmente bajo condiciones de estrés.

Las formulaciones microbianas en polvo serían ideales porque su transporte es económico y no se requiere de refrigeración para conservar el producto. La desecación puede conseguirse de varias formas, dos de las cuales son la liofilización y la desecación ambiental; ambas difieren por el tipo de estrés al que las células se enfrentan. Se han encontrado bacterias benéficas altamente tolerantes a la desecación, las cuales son candidatas para ser aplicadas en zonas de escasez de agua y para la formulación de inoculantes en polvo más estables. Sin embargo, muchas bacterias benéficas son sensibles a la desecación. *P. putida* KT2440 tiene una menor capacidad de tolerancia en comparación con las bacterias benéficas resistentes, sin embargo, tiene la característica de entrar a un estado VBNC y retornar al estado cultivable, tras la rehidratación prolongada o bien retornar de forma rápida con una

rehidratación en presencia de exudados. Entender la forma en que podemos proteger a la bacteria de la desecación nos ayudará a incrementar la supervivencia de la bacteria cuando se enfrenta a condiciones limitantes de agua. La trehalosa es un disacárido no reductor que protege a la membrana de *P. putida* KT2440, tanto a la desecación por liofilización como a la desecación ambiental. Aún se desconoce el tiempo límite que esta protección puede otorgar si la bacteria se resguarda en presencia de aire, independientemente del método usado para la desecación. En acuerdo con los datos generados a la fecha, un cambio en la composición de los fosfolípidos de la membrana, especialmente en el aumento del C17:ciclopropano, puede capacitar a las bacterias para tolerar más a la liofilización, pero se desconoce si puede incrementar en condiciones de desecación ambiental. Los estudios de transcriptómica nos revelan varios genes que pudieran estar implicados en la respuesta de *P. putida* KT2440 tanto para soportar a la desecación, como para retornar a su cultivabilidad. Estudios futuros permitirán entender mejor como podríamos incrementar la supervivencia de la bacteria rumbo a la generación de inoculantes en polvo más estables para aprovechar sus potencialidades tras la rehidratación.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la VIEP y al Comité de Internacionalización de la Investigación, ambos de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por el apoyo otorgado para el desarrollo de proyectos del grupo “Ecology and Survival of Microorganisms”.

## REFERENCIAS

- [1]. Patel R. The Long Green Revolution. J Peasant Stud [Internet]. 2013 Jan 1;40(1):1–63. Available from: <https://doi.org/10.1080/03066150.2012.719224>
- [2]. Pazos-Rojas LA, Marín-Cevada V, Elizabeth Y, García M, Baez A. Uso de microorganismos benéficos para reducir los daños causados por la revolución verde. Rev Iberoam Ciencias. 2016;3(7):72–85.
- [3]. Mahmood I, Imadi SR, Shazadi K, Gul A, Hakeem KR. Effects of Pesticides on Environment - Plant, Soil and Microbes: Implications in Crop Science. In: Hakeem KR, Akhtar MS, Abdullah SNA, editors. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 253–69. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3_13)
- [4]. Choudhury PP. Transformation of Herbicides in the Environment BT - Herbicide Residue Research in India. In: Sondhia S, Choudhury PP, Sharma AR, editors. Singapore: Springer Singapore; 2019. p. 415–42. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-981-13-1038-6\\_15](https://doi.org/10.1007/978-981-13-1038-6_15)



- [5]. Choudri BS, Charabi Y, Ahmed M. Pesticides and Herbicides. *Water Environ Res* [Internet]. 2018 Oct 1;90(10):1663–78. Available from: <https://doi.org/10.2175/106143018X15289915807362>
- [6]. Dich J, Zahm SH, Hanberg A, Adami H-O. Pesticides and cancer. *Cancer Causes Control* [Internet]. 1997;8(3):420–43. Available from: <https://doi.org/10.1023/A:1018413522959>
- [7]. Sabarwal A, Kumar K, Singh RP. Hazardous effects of chemical pesticides on human health—Cancer and other associated disorders. *Environ Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2018;63:103–14. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668918303077>
- [8]. Davoren MJ, Schiestl RH. Glyphosate-based herbicides and cancer risk: a post-IARC decision review of potential mechanisms, policy and avenues of research. *Carcinogenesis* [Internet]. 2018 Oct 8;39(10):1207–15. Available from: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy105>
- [9]. Jabłońska-Trypuć A, Wydro U, Wołejko E, Butarewicz A. Toxicological Effects of Traumatic Acid and Selected Herbicides on Human Breast Cancer Cells: *In Vitro* Cytotoxicity Assessment of Analyzed Compounds. *Molecules*. 2019;24(9):1710. Available from: <https://doi.org/10.3390/molecules24091710>
- [10]. Kozyrovska N, Kovtunovych G, Gromosova E, Kuharchuk P, Kordyum V. Novel inoculants for an environmentally-friendly crop production. *Stud Environ Sci*. 1997;66(C):729–35.
- [11]. Majeed A, Muhammad Z, Ahmad H. Plant growth promoting bacteria: role in soil improvement, abiotic and biotic stress management of crops. *Plant Cell Rep*. 2018;37(12):1599–609.
- [12]. Baez-Rogelio A, Morales-García YE, Quintero-Hernández V, Muñoz-Rojas J. Next generation of microbial inoculants for agriculture and bioremediation. *Microb Biotechnol*. 2017;10(1):19–21.
- [13]. Oleńska E, Małek W, Wójcik M, Swiecicka I, Thijs S, Vangronsveld J. Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. *Sci Total Environ* [Internet]. 2020;743:140682. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969720342042>
- [14]. Rilling JI, Acuña JJ, Nannipieri P, Cassan F, Maruyama F, Jorquera MA. Current opinion and perspectives on the methods for tracking and monitoring plant growth-promoting bacteria. *Soil Biol Biochem* [Internet]. 2019;130:205–19. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003807171830422X>
- [15]. Hassan MK, McInroy JA, Kloepper JW. The Interactions of Rhizodeposits with Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in the Rhizosphere: A Review. *Agriculture*. 2019; 9(7):142.
- [16]. Cardoso P, Alves A, Silveira P, Sá C,

Fidalgo C, Freitas R, *et al.* Bacteria from nodules of wild legume species: Phylogenetic diversity, plant growth promotion abilities and osmotolerance. *Sci Total Environ* [Internet]. 2018;645:1094–102. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969718324756>

[17]. Adeleke BS, Babalola OO, Glick BR. Plant growth-promoting root-colonizing bacterial endophytes. *Rhizosphere* [Internet]. 2021;20:100433. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452219821001294>

[18]. Molina-Romero D, Morales-García YE, Bustillos-Cristales MR, Rodríguez-Andrade O, Santiago-Saenz Y, Muñoz-Rojas J, *et al.* Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Rev la DES Ciencias Biológico Agropecu.* 2015;17(2) (February 2016):24–34.

[19]. Morales-García YE, Muñoz-Rojas J, Baez A, Molina-Romero D, Rivera-Urbalejo AP, Pazos-Rojas LA. Bacterial Mixtures, the Future Generation of Inoculants for Sustainable Crop Production. Vol. 23. 2019. 385–410 p.

[20]. Wei T, Lv X, Jia HL, Hua L, Xu HH, Zhou R, *et al.* Effects of salicylic acid, Fe(II) and plant growth-promoting bacteria on Cd accumulation and toxicity alleviation of Cd tolerant and sensitive tomato genotypes. *J Environ Manage.* 2018;214:164–71.

[21]. Zafar-ul-hye M, Naeem M, Danish S, Khan MJ, Fahad S, Datta R, *et al.* Effect of cadmium-tolerant rhizobacteria on growth

attributes and chlorophyll contents of bitter gourd under cadmium toxicity. *Plants.* 2020;9(10):1–21.

[22]. Akkaya Ö. *Nicotiana tabacum*-associated bioengineered *Pseudomonas putida* can enhance rhizoremediation of soil containing 2,4-dinitrotoluene. *3 Biotech.* 2020;10(9):1–11.

[23]. Pazos-Rojas LA, Rodríguez-Andrade O, Catalina Muñoz-Arenas L, Morales-García Y, Corral Lugo A, Quintero-Hernandez V, *et al.* Desiccation-tolerant rhizobacteria maintain their plant growth Promoting capability after experiencing extreme water stress. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2018;1(May):1–13. Available from: [https://www.researchgate.net/profile/Jesus\\_Munoz-Rojas/publication/325094145](https://www.researchgate.net/profile/Jesus_Munoz-Rojas/publication/325094145)

[24]. Timmusk S, Behers L, Muthoni J, Muraya A, Aronsson A-C. Perspectives and Challenges of Microbial Application for Crop Improvement. *Front Plant Sci* [Internet]. 2017;8:49. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.00049>

[25]. Ghosh N. Promoting Bio-fertilizers in Indian Agriculture. 2004;1–26. Available from: [http://ipni.net/ipniweb/portal.nsf/0/94cfd5a0ed0843028525781c0065437e/\\$FILE/12%20South%20Asia.Ghosh.Promoting%20Bio-fertilizers%20in%20India%20Agri.pdf](http://ipni.net/ipniweb/portal.nsf/0/94cfd5a0ed0843028525781c0065437e/$FILE/12%20South%20Asia.Ghosh.Promoting%20Bio-fertilizers%20in%20India%20Agri.pdf)

[26]. Morales-García YE, Baez A, Quintero-Hernández V, Molina-Romero D, Rivera-Urbalejo AP, Pazos-Rojas LA, *et al.* Bacterial mixtures, the future generation of inoculants for sustainable crop production. *Sustainable*



Development and Biodiversity 23. In: Maheshwari DK, Dheeman S, editors. Field Crops: Sustainable Management by PGPR. First. Swizerland: Springer Nature Swizerland AG; 2019. p. 11–44.

[27]. Morales-García YE, Juárez-Hernández D, Hernández-Tenorio A-L, Muñoz-Morales JM, Baez A, Muñoz-Rojas J. Inoculante de segunda generación para incrementar el crecimiento y salud de plantas de jardín. Alianzas y Tendencias BUAP [Internet]. 2020;5(20):136–54. Available from: <https://drive.google.com/file/d/1hnGVyOqfJdr s8F-LIXeE5FrL1H6MP6nU/view>

[28]. Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. Annu Rev Microbiol. 2009;63(1):541–56.

[29]. Pacheco I, Ferreira R, Correia P, Carvalho L, Dias T, Cruz C. Microbial consortium increases maize productivity and reduces grain phosphorus concentration under field conditions. Saudi J Biol Sci. 2021;28(1):232–7.

[30]. Molina-Romero D, Juárez-Sánchez S, Venegas B, Ortíz-González CS, Baez A, Morales-García YE, *et al.* A Bacterial Consortium Interacts With Different Varieties of Maize, Promotes the Plant Growth, and Reduces the Application of Chemical Fertilizer Under Field Conditions. Front Sustain Food Syst. 2021;4(January).

[31]. Figueredo MS, Tonelli ML, Ibáñez F, Morla F, Cerioni G, del Carmen Tordable M, *et al.* Induced systemic resistance and symbiotic performance of peanut plants challenged with fungal pathogens and co-inoculated with the

biocontrol agent *Bacillus* sp. CHEP5 and *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. Microbiol Res. 2017;197:65–73.

[32]. Khan WU, Ahmad SR, Yasin NA, Ali A, Ahmad A. Effect of *Pseudomonas fluorescens* RB4 and *Bacillus subtilis* 189 on the phytoremediation potential of *Catharanthus roseus* (L.) in Cu and Pb-contaminated soils. Int J Phytoremediation. 2017;19(6):514–21.

[33]. Madhaiyan M, Poonguzhali S, Kang BG, Lee YJ, Chung JB, Sa TM. Effect of co-inoculation of methylotrophic *Methylobacterium oryzae* with *Azospirillum brasilense* and *Burkholderia pyrrocinia* on the growth and nutrient uptake of tomato, red pepper and rice. Plant Soil. 2010;328(1):71–82.

[34]. Dileep Kumar BS, Berggren I, Mårtensson AM. Potential for improving pea production by co-inoculation with fluorescent *Pseudomonas* and *Rhizobium*. Plant Soil. 2001;229(1):25–34.

[35]. Shahzad SM, Khalid A, Arif MS, Riaz M, Ashraf M, Iqbal Z, *et al.* Co-inoculation integrated with P-enriched compost improved nodulation and growth of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) under irrigated and rainfed farming systems. 2014;1–12.

[36]. Molina-Romero D, Baez A, Quintero-Hernández V, Castañeda-Lucio M, Fuentes-Ramírez LE, Bustillos-Cristales M del R, *et al.* Compatible bacterial mixture, tolerant to desiccation, improves maize plant growth. PLoS One [Internet]. 2017 Nov 8;12(11):e0187913. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187913>

- [37]. Mondal S, Halder SK, Yadav AN, Mondal KC. Microbial Consortium with Multifunctional Plant Growth-Promoting Attributes: Future Perspective in Agriculture. In: Yadav AN, Rastegari AA, Yadav N, Kour D, editors. *Advances in Plant Microbiome and Sustainable Agriculture: Functional Annotation and Future Challenges* [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2020. p. 219–58. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-981-15-3204-7\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-15-3204-7_10)
- [38]. Vivanco-Calixto R, Molina-Romero D, Morales-García YE, Quintero-Hernández V, Munive-Hernández JA, Baez-Rogelio A, *et al.* Reto agrobiotecnológico: inoculantes bacterianos de segunda generación. *Alianzas y Tendencias BUAP* [Internet]. 2016;1(1):1–10. Available from: <https://www.aytbuap.mx/publicaciones/#h.26a62fnd2t88>
- [39]. Bashan Y, de-Bashan LE, Prabhu SR, Hernandez JP. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant Soil*. 2014;378(1–2):1–33.
- [40]. Bashan Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol Adv* [Internet]. 1998;16(4):729–70. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975098000032>
- [41]. Nehra V, Choudhary M. A review on plant growth promoting rhizobacteria acting as bioinoculants and their biological approach towards the production of sustainable agriculture. *J Appl Nat Sci*. 2015;7(1):540–56.
- [42]. Muñoz-Rojas J, Morales-García YE, Baez-Rogelio A, Quintero-Hernández V, Rivera-Urbalejo AP, Pérez-y-Terrón R. Métodos económicos para la cuantificación de microorganismos. In: *Instituciones de Educación Superior La labor investigadora e innovadora en México* [Internet]. Science Associated Editors L.L.C.; 2016. p. 67–82. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/312067522\\_Metodos\\_economicos\\_para\\_la\\_cuantificacion\\_de\\_microorganismos](https://www.researchgate.net/publication/312067522_Metodos_economicos_para_la_cuantificacion_de_microorganismos)
- [43]. Daza A, Santamaría C, Rodríguez-Navarro DN, Camacho M, Orive R, Temprano F. Perlite as a carrier for bacterial inoculants. *Soil Biol Biochem* [Internet]. 2000;32(4):567–72. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071799001856>
- [44]. Casteriano A, Wilkes MA, Deaker R. Physiological changes in rhizobia after growth in peat extract may be related to improved desiccation tolerance. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(13):3998–4007.
- [45]. Velineni S, Brahmaprakash GP. Survival and Phosphate Solubilizing Ability of *Bacillus megaterium* in Liquid Inoculants under High Temperature and Desiccation Stress [Internet]. 2011 Sep 1;13(5):795–802. Available from: <http://jast.modares.ac.ir/article-23-3947-en.html>
- [46]. Streeter JG. Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. *J Appl Sci Environ Manag*.

2003;(1993):484–91.

[47]. Greffe VRG, Michiels J. Desiccation-induced cell damage in bacteria and the relevance for inoculant production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020;104(9):3757–70.

[48]. Pimentel D, Berger B, Filiberto D, Newton M, Wolfe B, Karabinakis E, *et al.* Water Resources: Agricultural and Environmental Issues. *Bioscience* [Internet]. 2004 Oct 1;54(10):909–18. Available from: [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2004\)054\[0909:WRAAEI\]2.0.CO](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2004)054[0909:WRAAEI]2.0.CO)

[49]. Savary S, Castilla NP, Elazegui FA, Teng PS. Multiple effects of two drivers of agricultural change, labour shortage and water scarcity, on rice pest profiles in tropical Asia. *F Crop Res* [Internet]. 2005;91(2):263–71. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378429004001856>

[50]. Batisani N, Yarnal B. Rainfall variability and trends in semi-arid Botswana: Implications for climate change adaptation policy. *Appl Geogr* [Internet]. 2010;30(4):483–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143622809000733>

[51]. Gornall J, Betts R, Burke E, Clark R, Camp J, Willett K, *et al.* Implications of climate change for agricultural productivity in the early twenty-first century. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2010;365(1554):2973–89.

[52]. Esbelin J, Santos T, Hébraud M. Desiccation: An environmental and food industry stress that bacteria commonly face.

*Food Microbiol* [Internet]. 2018;69:82–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002017300631>

[53]. Bosch J, Varliero G, Hallsworth JE, Dallas TD, Hopkins D, Frey B, *et al.* Microbial anhydrobiosis. *Environ Microbiol* [Internet]. 2021 Aug 4;n/a(n/a). Available from: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15699>

[54]. Alpert P. The Limits and Frontiers of Desiccation-Tolerant Life1. *Integr Comp Biol* [Internet]. 2005 Nov 1;45(5):685–95. Available from: <https://doi.org/10.1093/icb/45.5.685>

[55]. Potts M. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev.* 1994;58(4):755–805.

[56]. Kumar A, Singh S, Gaurav AK, Srivastava S, Verma JP. Plant Growth-Promoting Bacteria: Biological Tools for the Mitigation of Salinity Stress in Plants. *Front Microbiol.* 2020;11(July):1–15.

[57]. Manzanera M. Dealing with water stress and microbial preservation. *Environ Microbiol* [Internet]. 2021 Jul 1;23(7):3351–9. Available from: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15096>

[58]. Fredrickson JK, Li SW, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Zhai M, Sulloway HM, *et al.* Protein oxidation: key to bacterial desiccation resistance? *ISME J* [Internet]. 2008;2(4):393–403. Available from: <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.116>

[59]. Muñoz-Rojas J, Alatorre-Cruz JM, Bustillos-Cristales M del R, Morales-García

YE, Hernández-Tenorio A-L, Baez-Rogelio A, *et al.* Multi-species formulation to improve the growth from plants semi-desertic zones [Internet]. México; MX20150 14278A, 2015. p. 1–28. Available from:

[https://www.researchgate.net/publication/315800535\\_Multi-species\\_formulation\\_to\\_improve\\_the\\_growth\\_from\\_plants\\_semi-desertic\\_zones](https://www.researchgate.net/publication/315800535_Multi-species_formulation_to_improve_the_growth_from_plants_semi-desertic_zones)

[60]. Rojas-Tapias D, Ortiz-Vera M, Rivera D, Kloepper J, Bonilla R. Evaluation of three methods for preservation of *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter vinelandii*. *Univ Sci.* 2013;18(2):129–39.

[61]. Muñoz-Rojas J, Bernal P, Duque E, Godoy P, Segura A, Ramos J. Involvement of Cyclopropane Fatty Acids in the Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to Freeze-Drying. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(1):472–7.

[62]. Pazos-Rojas LA, Muñoz-Arenas LC, Rodríguez-Andrade O, López-Cruz LE, López-Ortega O, Lopes-Olivares F, *et al.* Desiccation-induced viable but nonculturable state in *Pseudomonas putida* KT2440, a survival strategy. *PLoS One* [Internet]. 2019 Jul 19;14(7):e0219554. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219554>

[63]. Jałowiecki Ł, Krzysińska I, Górka M, Płaza G, Ratman-Kłosińska I. Effect of the freeze-drying process on the phenotypic diversity of *Pseudomonas putida* strains isolated from the interior of healthy roots of *Sida hermaphrodita*: Phenotype microarrays (PMs). *Cryobiology* [Internet]. 2020;96:145–

51. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224020302327>

[64]. Wessman P, Håkansson S, Leifer K, Rubino S. Formulations for freeze-drying of bacteria and their influence on cell survival. *J Vis Exp.* 2013;(78):1–5.

[65]. Shivkumar G, Kazarin PS, Strongrich AD, Alexeenko AA. LyoPRONTO: an Open-Source Lyophilization Process Optimization Tool. *AAPS PharmSciTech.* 2019;20(8):1–17.

[66]. Steven L N, Shan J, Suchart C, Shawn A. K. Fundamentals of Freeze Drying. *Free Pharm Food Prod.* 2010;18–67.

[67]. Miyamoto-Shinohara Y, Sukenobe J, Imaizumi T, Nakahara T. Survival of freeze-dried bacteria. *J Gen Appl Microbiol.* 2008;54(1):9–24.

[68]. Fonseca F, Cenard S, Passot S. Freeze-Drying of Lactic Acid Bacteria BT- Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. In: Wolkers WF, Oldenhof H, editors. New York, NY: Springer New York; 2015. p. 477–88. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5\\_24](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5_24)

[69]. Leslie SB, Israeli E, Lighthart B, Crowe JH, Crowe LM. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61(10):3592–7.

[70]. Morales-García Y-E, Duque E, Rodríguez-Andrade O, de la Torre J, Martínez-Contreras R-D, Pérez R, *et al.* Bacterias Preservadas, una Fuente Importante de

Recursos Biotecnológicos. Bio Tecnol. 2010;14(2):11–29.

[71]. Kupletskaya MB, Netrusov AI. Viability of lyophilized microorganisms after 50-year storage. *Microbiology*. 2011;80(6):850–3.

[72]. Strasser S, Neureiter M, Geppl M, Braun R, Danner H. Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol*. 2009;107(1):167–77.

[73]. Zhao G, Zhang G. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2005 Aug 1;99(2):333–8. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02587.x>

[74]. Polo L, Mañes-Lázaro R, Olmeda I, Cruz-Pio LE, Medina Á, Ferrer S, *et al.* Influence of freezing temperatures prior to freeze-drying on viability of yeasts and lactic acid bacteria isolated from wine. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2017 Jun 1;122(6):1603–14. Available from: <https://doi.org/10.1111/jam.13465>

[75]. Sahgal M, Jaggi V. Rhizobia: Culture Collections, Identification, and Methods of Preservation BT - Microbial Resource Conservation: Conventional to Modern Approaches. In: Sharma SK, Varma A, editors. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 175–97. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-96971-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-96971-8_6)

[76]. Regenhardt D, Heuer H, Heim S, Fernandez DU, Strömpl C, Moore ERB, *et al.*

Brief report Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440. *Environ Microbiol*. 2002;4:912–5.

[77]. Marqués S, Ramos JL. Transcriptional control of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid catabolic pathways. *Mol Microbiol*. 1993;9(5):923–9.

[78]. Molina L, Ramos C, Duque E, Ronchel MC, García JM, Wyke L, *et al.* Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biol Biochem*. 2000 Mar;32(3):315–21.

[79]. D’Alvise PW, Sjöholm OR, Yankelevich T, Jin Y, Wuertz S, Smets BF. TOL plasmid carriage enhances biofilm formation and increases extracellular DNA content in *Pseudomonas putida* KT2440. *FEMS Microbiol Lett*. 2010;312(1):84–92.

[80]. Martins Dos Santos VAP, Heim S, Moore ERB, Strätz M, Timmis KN. Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol*. 2004;6(12):1264–86.

[81]. Nelson KE, Weinel C, Paulsen IT, Dodson RJ, Hilbert H, Martins dos Santos VAP, *et al.* Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* [Internet]. 2002 Dec 1;4(12):799–808. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00366.x>

[82]. Belda E, van Heck RGA, José Lopez-Sanchez M, Cruveiller S, Barbe V, Fraser C, *et*

*al.* The revisited genome of *Pseudomonas putida* KT2440 enlightens its value as a robust metabolic chassis. *Environ Microbiol.* 2016;18(10):3403–24.

[83]. Costa-Gutierrez SB, Lami MJ, Santo MCC-D, Zenoff AM, Vincent PA, Molina-Henares MA, *et al.* Plant growth promotion by *Pseudomonas putida* KT2440 under saline stress: role of *eptA*. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2020;104(10):4577–92. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10516-z>

[84]. Choudhary DK, Johri BN. Interactions of *Bacillus* spp. and plants - With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiol Res.* 2009;164(5):493–513.

[85]. Matilla MA, Ramos JL, Bakker PAHM, Doornbos R, Badri D V, Vivanco JM, *et al.* *Pseudomonas putida* KT2440 causes induced systemic resistance and changes in *Arabidopsis* root exudation. *Environ Microbiol Rep* [Internet]. 2010 Jun 1;2(3):381–8. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00091.x>

[86]. Muñoz-Rojas J, Morales-García YE, Juárez-Hernández D, Fuentes-Ramírez LE, Munive-Hernández JA. Formulación de un inoculante multiespecies para potenciar el crecimiento de plantas [Internet]. México; MX2013007978A, 2013. p. 1–36. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/309550250>

[87]. Manzanera M, Castro AG De, Tøndervik A, Strøm AR, Tunnacliffe A. Hydroxyectoine

Is Superior to Trehalose for Anhydrobiotic Engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(9):4328–33.

[88]. Van De Mortel M, Halverson LJ. Cell envelope components contributing to biofilm growth and survival of *Pseudomonas putida* in low-water-content habitats. *Mol Microbiol* [Internet]. 2004 May 1;52(3):735–50. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04008.x>

[89]. Svenningsen NB, Pérez-Pantoja D, Nikel PI, Nicolaisen MH, de Lorenzo V, Nybroe O. *Pseudomonas putida* mt-2 tolerates reactive oxygen species generated during matrix stress by inducing a major oxidative defense response. *BMC Microbiol* [Internet]. 2015;15(1):202. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0542-1>

[90]. Vriezen JAC, De Bruijn FJ, Nüsslein K. Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen, and temperature. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(11):3451–9.

[91]. Laskowska E, Kuczyńska-Wiśnik D. New insight into the mechanisms protecting bacteria during desiccation. *Curr Genet* [Internet]. 2020;66(2):313–8. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00294-019-01036-z>

[92]. Rodríguez-Andrade O, Corral-Lugo A, Morales-García YE, Quintero-Hernández V, Rivera-Urbalejo AP, Molina-Romero D, *et al.* Identification of *Klebsiella variicola* T29A genes involved in tolerance to desiccation. *Open Microbiol J.* 2019;13(1):256–67.

[93]. Berninger T, González López Ó, Bejarano A, Preininger C, Sessitsch A. Minireview

Maintenance and assessment of cell viability in formulation of non-sporulating bacterial inoculants. *Microb Biotechnol*. 2018;11(2):277–300.

[94]. Uritani M, Takai M, Yoshinaga K. Protective Effect of Disaccharides Drying under Vacuum. *J Biochem*. 1995;779:774–9.

[95]. Shirkey B, McMaster NJ, Smith SC, Wright DJ, Rodriguez H, Jaruga P, *et al*. Genomic DNA of *Nostoc commune* (Cyanobacteria) becomes covalently modified during long-term (decades) desiccation but is protected from oxidative damage and degradation. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(12):2995–3005.

[96]. Stokell JR, Steck TR. Viable but Nonculturable Bacteria [Internet]. eLS. 2012. (Major Reference Works). Available from: <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000407.pub2>

[97]. Conway T, K. G. Microarray expression profiling: capturing a genome-wide portrait of the transcriptome. *Mol Microbiol* [Internet]. 2003 Feb 1;47(4):879–89. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03338.x>

[98]. Buck A, Oliver JD. Survival of spinach-associated *Helicobacter pylori* in the viable but nonculturable state. *Food Control* [Internet]. 2010;21(8):1150–4. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095671351000037X>

[99]. Orruño M, Kaberdin VR, Arana I. Survival strategies of *Escherichia coli* and *Vibrio* spp.: contribution of the viable but

nonculturable phenotype to their stress-resistance and persistence in adverse environments. *World J Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2017;33(3):45. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2218-5>

[100]. Vriezen JAC, de Bruijn FJ. Appearance of Membrane Compromised, Viable but Not Culturable and Culturable Rhizobial Cells as a Consequence of Desiccation [Internet]. *Biological Nitrogen Fixation*. 2015. p. 975–90. (Wiley Online Books). Available from: <https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch96>

[101]. López-Lara LI, Pazos-Rojas LA, López-Cruz LE, Morales-García YE, Quintero-Hernández V, De La Torre J, *et al*. Influence of rehydration on transcriptome during resuscitation of desiccated *Pseudomonas putida* KT2440. *Ann Microbiol*. 2020;70(1).

[102]. Zhang Y-M, Rock CO. Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2008;6(3):222–33. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1839>

[103]. Bernal P, Muñoz-Rojas J, Hurtado A, Ramos JL, Segura A. A *Pseudomonas putida* cardiolipin synthesis mutant exhibits increased sensitivity to drugs related to transport functionality. *Environ Microbiol* [Internet]. 2007 May 1;9(5):1135–45. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01236.x>

[104]. Rowlett VW, Mallampalli VKPS, Karlstaedt A, Dowhan W, Taegtmeier H, Margolin W, *et al*. The impact of membrane phospholipid alterations in *Escherichia coli* on cellular function. *J Bacteriol* [Internet].

2017;199(13):1–22. Available from:  
<http://jb.asm.org/content/199/13/e00849-16.full.pdf%0Ahttp://jb.asm.org/>

[105]. Filiatrault MJ. Progress in prokaryotic transcriptomics. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2011;14(5):579–86. Available from:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136952741100107X>

[106]. Skvortsov TA, Azhikina TL. A review of the transcriptome analysis of bacterial pathogens *in vivo*: Problems and solutions. *Russ J Bioorganic Chem* [Internet]. 2010;36(5):550–9. Available from:  
<https://doi.org/10.1134/S106816201005002X>

[107]. Korem M, Gov Y, Rosenberg M. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* following exposure to alcohol. *Microb Pathog* [Internet]. 2010;48(2):74–84. Available from:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401009001776>

[108]. Tie K, N. VRZ, L. GS. Global Gene Expression Analysis of the Heat Shock Response in the Phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *J Bacteriol* [Internet]. 2006 Aug 15;188(16):5821–30. Available from:  
<https://doi.org/10.1128/JB.00182-06>

[109]. Estrella D, José-Juan R-H, Jesús de la T, Patricia D-C, Jesús M-R, Juan-Luis R. The RpoT Regulon of *Pseudomonas putida* DOT-T1E and Its Role in Stress Endurance against Solvents. *J Bacteriol* [Internet]. 2007 Jan 1;189(1):207–19. Available from:  
<https://doi.org/10.1128/JB.00950-06>

[110]. Lowe R, Shirley N, Bleackley M, Dolan S, Shafee T. Transcriptomics technologies.

*PLOS Comput Biol* [Internet]. 2017 May 18;13(5):e1005457. Available from:  
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005457>

[111]. Kollanoor Johny A, Frye JG, Donoghue A, Donoghue DJ, Porwollik S, McClelland M, *et al.* Gene Expression Response of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis Phage Type 8 to Subinhibitory Concentrations of the Plant-Derived Compounds Trans-Cinnamaldehyde and Eugenol. *Front Microbiol* [Internet]. 2017;8:1828. Available from:  
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01828>

[112]. Ranjith K, Arunasri K, Reddy GS, Adicherla H, Sharma S, Shivaji S. Global gene expression in *Escherichia coli*, isolated from the diseased ocular surface of the human eye with a potential to form biofilm. *Gut Pathog* [Internet]. 2017;9(1):15. Available from:  
<https://doi.org/10.1186/s13099-017-0164-2>

[113]. Saliba A-E, C Santos S, Vogel J. New RNA-seq approaches for the study of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2017;35:78–87. Available from:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136952741730005X>

[114]. Hör J, Gorski SA, Vogel J. Bacterial RNA Biology on a Genome Scale. *Mol Cell* [Internet]. 2018;70(5):785–99. Available from:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276517309802>

[115]. Gulez G, Altıntaş A, Fazli M, Dechesne A, Workman CT, Tolker-Nielsen T, *et al.* Colony morphology and transcriptome profiling of *Pseudomonas putida* KT2440 and

its mutants deficient in alginate or all EPS synthesis under controlled matrix potentials. *Microbiologyopen* [Internet]. 2014 Aug 1;3(4):457–69. Available from: <https://doi.org/10.1002/mbo3.180>

[116]. Gülez G, Dechesne A, Workman CT, Smets BF. Transcriptome Dynamics of *Pseudomonas putida* KT2440 under Water Stress. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2012 Feb 1;78(3):676–83. Available from: <https://doi.org/10.1128/AEM.06150-11>

[117]. Halverson LJ. Role of Alginate in Bacterial Biofilms. In: Rehm BHA, editor. *Alginates: Biology and Applications* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009. p. 135–51. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-540-92679-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-540-92679-5_6)

[118]. Woo-Suk C, Martijn van de M, Lindsey N, Gabriela N de G, Xiaohong L, J. HL. Alginate Production by *Pseudomonas putida* Creates a Hydrated Microenvironment and Contributes to Biofilm Architecture and Stress

Tolerance under Water-Limiting Conditions. *J Bacteriol* [Internet]. 2007 Nov 15;189(22):8290–9. Available from: <https://doi.org/10.1128/JB.00727-07>

[119]. Nielsen L, Li X, Halverson LJ. Cell–cell and cell–surface interactions mediated by cellulose and a novel exopolysaccharide contribute to *Pseudomonas putida* biofilm formation and fitness under water-limiting conditions. *Environ Microbiol* [Internet]. 2011 May 1;13(5):1342–56. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02432.x>

[120]. Gülez G, Dechesne A, Smets BF. The Pressurized Porous Surface Model: An improved tool to study bacterial behavior under a wide range of environmentally relevant matrix potentials. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2010;82(3):324–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016770121000206X>