BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

"ESTUDIO DEL PAPEL QUE TIENE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA TOLERANCIA A DESECACIÓN EN BACTERIAS DE INTERÉS AGRÍCOLA"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA) CON

OPCIÓN EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA

PRESENTA:

ING. AMB. LESTHER EMMANUEL LÓPEZ CRUZ

ASESOR DE TESIS

D.C. ANTONINO BAEZ ROGELIO

CO-ASESOR

D.C VIANEY MARÍN CEVADA

PUEBLA, PUE. **MAYO 2017**

INDICE

INDICE DE FIGURAS 2
INDICE DE TABLAS 3
RESUMEN 4

I. INTRODUCCIÓN 5
1.1 Bacterias Benéficas y su aplicación biotecnológica 5
1.2 Inoculantes bacterianos 6
1.3 Fenómeno de desecación y el estrés oxidativo 8
1.4 Especies reactivas de oxígeno y daño celular 9
1.5 Línea de defensa contra el estrés oxidativo 10
1.5.1 Superóxido Dismutasas 11
1.5.2 Catalasas y Peroxidasas 11

II. ANTECEDENTES 13

III. JUSTIFICACIÓN 16

4. Hipótesis 16

5. Objetivos 17
5.1 Objetivo General 17
5.2 Objetivos específicos 17

6. MATERIAL Y MÉTODOS 18
6.1 Condiciones de crecimiento de *Pseudomonas putida* KT2440 18
6.2 Supervivencia de *P. putida* KT2440 en condiciones de desecación 19
6.3.1 Número de UFC/ml y BSR antes y después de la desecación 20
6.4 Medición de las especies Reactivas de Oxígeno intracelular 20
6.5 Medición de Actividad de las SOD 22
6.6 Cambios de Expresión en Genes de defensa ante estrés oxidativo 23
6.6.1 Extracción de ARN total 23
6.6.2 Purificación de RNA 24
6.6.3 Reacción en Cadena de la polimerasa Cuantitativa en tiempo real (RTqPCR) 25
6.6.4 Oligonucleótidos específicos de genes involucrados en la defensa ante estrés oxidativo de *Pseudomonas putida* KT2440 25
6.7 Determinación del daño a membrana en *P. putida* KT2440 27
6.7.1 Daño a membrana por Microscopía de Fluorescencia 27
6.7.2 Cuantificación del daño a membrana por lipoperoxidación 27

7. RESULTADOS 29
7.1 Determinación de la BSR 29
7.2 Cuantificación de las ROS intracelulares 33
7.3 Actividad Total de las SOD 34
7.4 Análisis de la Expresión genética en condiciones de desecación 35
7.5 Daño a Membrana 40

8. DISCUSIÓN **43**
9. CONCLUSIONES **50**
10. BIBLIOGRAFÍA **51**

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Interacciones rizósfera/bacteria. (Souza et al., 2015). 6

Figura 2. Plásmido pJMR1 con el gen XvPer1 para la obtención de la cepa derivada de P.putida KT2440. 15

Figura 3. Crecimiento de las células de Pseudomonas putida KT2440. 18

Figura 4. Diagrama de experimento de desecación. 19

Figura 5. Mecanismo para medición de ROS intracelular. Cell Biolabs OxiSelect Intracellular ROS Assay KIT (Green Fluorescense). 21

Figura 6. Principio del ensayo SOD. 19160 SOD determination KIT (Sigma-Aldrich). 22

Figura 7. Experimento de desecación partiendo de bacterias en fase exponencial de las cepas de Pseudomonas putida KT2440. 29

Figura 8. *Experimento de desecación con bacterias crecidas hasta la fase estacionaria de las cepas de Pseudomonas putida KT2440.* 30

Figura 9. Monitoreo diario de la BSR en Pseudomonas putida KT2440 cepa silvestre y modificada bajo condiciones de desecación. 31

Figura 10. Regresión lineal de la disminución de la BSR de la cepa silvestre durante la desecación. 32

Figura 11. Regresión lineal de la disminución de la BSR de la cepa XvPer1-6a durante la desecación**.** 32

Figura 12. Cuantificación de las Especies Reactivas de Oxígeno durante la desecación. 33

Figura 13. Medición de la actividad enzimática Superóxido dismutasas bajo condiciones de desecación. 34

Figura 14. Expresión del gen *XvPer1* de la cepa derivada en condiciones de desecación. 35

Figura 15. Análisis de la expresión de los genes *sodA, sodB, katA y katB* en la cepa silvestre de Pseudomonas putida KT2440. 36

Figura 16. Análisis de la expresión de los genes *sodA, sodB, katA y katB* en la cepa de Pseudomonas putida KT2440 XvPer1-6a. 36

Figura 17. Análisis de la expresión de los genes *trxB, ahpC, zwf-1 y fumC-1* en la cepa de Pseudomonas putida KT2440. 38

Figura 18. Análisis de la expresión de los genes *trxB, ahpC, zwf-1 y fumC-1* en la cepa de Pseudomonas putida KT2440 XvPer1-6a..... 38

Figura 19. Expresión de *oprH* durante la desecación..... 39

Figura 20. Expresión de genes del sistema de reparación de DNA mismatch bajo condiciones de desecación..... 40

Figura 21. Observación del daño a membrana, mediante microscopía de fluorescencia (100X) con el Kit LIVE/DEAD. 41

Figura 22. Acumulación de hidroperóxidos en las cepas de Pseudomonas putida KT2440 al final de la desecación. 42

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes de medio LB utilizada para crecimiento de cepas Pseudomonas putida KT2440..... 18

Tabla 2. Diseño experimental SOD..... 23

Tabla 3. Kit para remover ADN genómico..... 24

Tabla 4. Oligonucleotidos utilizados para el análisis por RT-qPCR..... 26

RESUMEN

En este trabajo se exploró la respuesta celular contra el estrés oxidativo y su relación con la supervivencia de las dos cepas de *Pseudomonas putida* KT2440 bajo condiciones de desecación, así como el efecto producido por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el interior de la célula, y la respuesta antioxidante de la bacteria. En el presente trabajo de investigación se utilizaron dos cepas de *Pseudomonas putida* KT2440, la cepa silvestre sensible a desecación y una cepa modificada, la cual tiene inserto un gen denominado *XvPer1* proveniente de *Xerophyta viscosa* que codifica para una 1-cys-peroxirredoxina que le confiere a esta bacteria mayor resistencia a estrés salino. Los experimentos realizados en este trabajo de investigación demostraron que la cepa modificada con el gen *XvPer1* (XvPer1-6a), tiene una mayor tolerancia al fenómeno de desecación con lo que se pudo establecer la importancia de la actividad antioxidante para la defensa contra las especies reactivas de oxígeno (ROS) prevalentes durante el estrés por desecación. Los conocimientos generados en esta investigación sirven como base para comprender mejor el metabolismo de esta bacteria ante el estrés por desecación, y resalta aspectos importantes de la fisiología de *P. putida* que se deben considerar en el desarrollo de inoculantes microbianos tolerantes a desecación.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Bacterias Benéficas y su aplicación biotecnológica

En la actualidad el uso de los microorganismos para el desarrollo de tecnologías y productos es cada vez mayor, los microrganismos son importantes por muchas razones dentro del área biotecnológica, la principal, la producción de productos de valor agregado. La biotecnología es un área clave que ha impactado de manera positiva varias tecnologías basadas en la aplicación de procesos de manufactura, agricultura, procesos de alimentos, medicina, protección ambiental (Jhamaria & Yadav, 2013). A través del uso de microorganismos la biotecnología se ha convertido en una ciencia clave del nuevo siglo para la protección y mitigación del medio ambiente. En la actualidad el uso excesivo de los agroquímicos ha provocado un daño ambiental significativo, principalmente con el deterioro de la calidad de los suelos de cultivo, por lo que se busca la implementación de nuevas tecnologías que puedan garantizar la producción de alimentos.

En el suelo existe una amplia diversidad de bacterias, algunas con el potencial para promover el crecimiento vegetal a través de ciertas interacciones. Antoun & Prevost (2005) y Souza *et al.,* (2015), mencionan que en la rizósfera ocurren muchas e importantes interacciones entre planta, suelo, microorganismos y micro fauna del suelo, que son determinantes para la salud de la planta, la productividad y fertilidad del suelo, como se observa en la Figura 1. Estas bacterias con la capacidad de favorecer el crecimiento vegetal, se denominan rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR), un grupo de bacterias de vida libre que colonizan la rizósfera y benefician el crecimiento de plantas y que incluyen diversos géneros como *Azospirillium, Bacillus, Burkholderia, Klebsiella, Pseudomonas*, etc. (Khalid *et al.,* 2004).

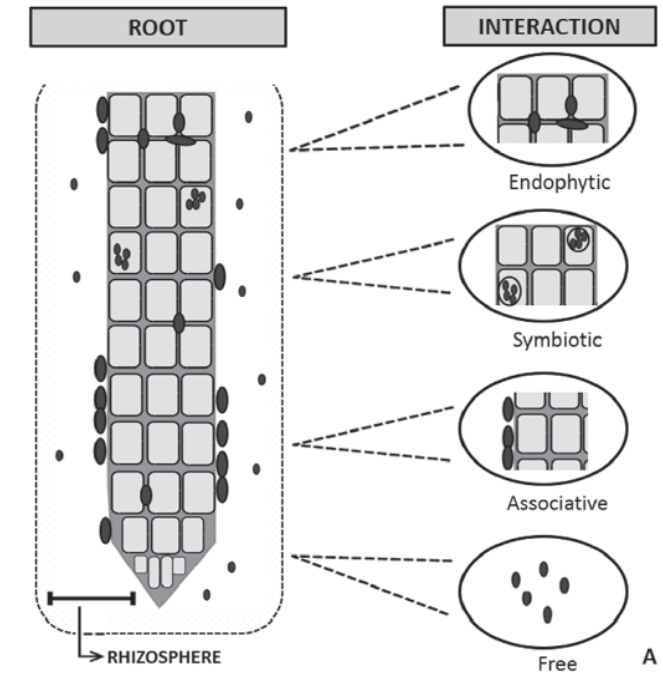


Figura 1. *Interacciones rizósfera/bacteria. (Souza et al., 2015).*

La inoculación de plantas con bacterias benéficas puede enriquecer los suelos de los campos de cultivos, el uso de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB o rizobias) promueven que las plantas tengan una mayor absorción de nutrientes. Sin embargo se deben considerar algunos aspectos importantes para obtener una inoculación exitosa, como es la competitividad de las bacterias que serán aplicadas en el suelo, su efectividad en la promoción del crecimiento de las plantas y su capacidad para colonizar adecuadamente la rizósfera de las plantas que se desea inocular (Schoebitz *et al.,* 2013; Bashan *et al.,* 2014; Souza *et al.,* 2015).

1.2 Inoculantes bacterianos

Bacterias tipo PGPR han sido utilizadas para el desarrollo de los llamados inoculantes microbianos. Ben Rebah *et al.* (2007), define a los inoculantes como formulaciones comerciales que contienen bacterias benéficas para las plantas que pueden ser directamente aplicadas a semillas o al suelo durante la plantación. Aunque los inoculantes tienen el potencial para reemplazar parcial o totalmente el uso de agroquímicos, su aceptación comercial ha sido limitada por la inconsistencia en su efectividad en campo, y que se relacionan con las condiciones ambientales extremadamente hostiles que

experimentan las bacterias que constituyen un inoculante, desde su producción hasta su aplicación en el campo.

Para garantizar la efectividad de un inoculante comercial, evitando así la variabilidad de resultados en el campo, se debe contar con una adecuada formulación del producto. Bashan *et al.* (1998) describen que la formulación de los inoculantes debe proveer un microambiente adecuado para que las bacterias contenidas en la formulación reciban protección física, el aporte de nutrientes necesarios y otros factores que garanticen una alta viabilidad celular durante el periodo de almacenamiento y su llegada al campo. Sin embargo, exiten dos problemas principales que complican la comercialización de los inoculantes microbianos, como son la pérdida de la viabilidad durante el almacenamiento y el corto periodo de estabilidad de estos productos. En la actualidad existen diversas presentaciones de inoculantes que van desde los productos líquidos, sólidos y los encapsulados (Schoebitz *et al.,* 2013; Bashan *et al.,* 2014).

Después de la producción en fermentadores, los microorganismos benéficos deben tolerar las condiciones de almacenamiento (6 meses o más), de transporte y mantener una alta viabilidad celular hasta el momento de su aplicación. Una vez que son aplicadas en suelo, las bacterias del inoculante deben competir con una amplia diversidad de microrganismos nativos que están mejor adaptados, adicionalmente deben enfrentar condiciones adversas como son la desecación, predación, salinidad, alta temperaturas, limitada disponibilidad de nutrientes y pH extremos. Lo anterior puede limitar el crecimiento y los efectos benéficos de cualquier bacteria que es introducida en el suelo (Ramos *et al.,* 2001; Armenta-Bojorquez *et al.,* 2010; Herrmann & Lesueur 2013).

Aunque la producción de los inoculantes microbianos actualmente es una estrategia viable y con mucho potencial para sustituir gradualmente el uso de los agroquímicos, aún existen muchos retos que resolver para lograr la obtención de inoculantes eficientes de manera comercial.

1.3 Fenómeno de desecación y el estrés oxidativo

La escasez de agua es uno de los mayores retos que enfrenta la agricultura, principalmente en regiones áridas y semiáridas (Rueda-Puente *et al.,* 2011; Vriezen *et al.,* 2007). La limitada disponibilidad de agua en el suelo, determina la actividad microbiana y viabilidad celular (Uhlívora *et al.,* 2005). La adaptación a la desecación se puede definir como la habilidad que posee un organismo para equilibrar el potencial de agua interna con la humedad del ambiente, y la habilidad para restablecer sus funciones normales después de la rehidratación (Alpert, 2005). De la misma manera Alpert (2005) define la resistencia a la desecación, como la habilidad de un organismo para sobrevivir a la perdida de agua intracelular, total o parcial sin sufrir daño y de recuperar su estado fisiológico normal después de la rehidratación. Estos microorganismos con habilidad para sobrevivir a las condiciones de desecación también deben tener la capacidad de tolerar estrés por radiación, especies reactivas de oxígeno (ROS), concentraciones de sales y solutos, así como temperaturas extremas. La desecación es un factor de estrés importante para los organismos vivos, debido a que con la perdida de agua en la célula, macromoléculas esenciales son inducidas para formar agregados no funcionales y orgánulos que colapsan (Alpert, 2006). La deshidratación es conocida por causar daño severo a los organismos a nivel de membrana así como de sus proteínas (Anchordoguy *et al.,* 1990; Prestrelski *et al.,* 1993; Potts, 1994). Durante la deshidratación la integridad de la membrana es afectada, comienza a dañarse irreversiblemente, provocando reacomodo de sus constituyentes (Crowe *et al.,* 2002).

Uno de los mecanismos moleculares de daño que conlleva a la muerte en células sensibles a desecación es el ataque de especies reactivas de oxígeno (Morgan *et al.,* 2006; Muñoz-Celaya *et al.,* 2012). El estrés oxidativo refiere al elevado nivel intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) que causa daño a lípidos, proteínas y ADN (Schieber & Chandel, 2014). Existen evidencias de que el proceso de deshidratación incrementa los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la célula y que dichos niveles se correlacionan con los niveles de supervivencia (Fernández-Sandoval *et al.,* 2012; Franca et al., 2005; Molina & Anchordoquy 2008; Muñoz-Celaya *et al.,* 2012; Imlay 2015). Hansen *et al.* (2006), así como

Miller *et al.* (2010) sugieren que este estrés por la pérdida de agua incrementa la formación de ROS produciendo peroxidación de lípidos, desnaturalización de las proteínas, y daño en ácidos nucleicos, y severas consecuencias en el metabolismo. Diversos microorganismos tienen la capacidad de sobrevivir al estrés generado ante la pérdida intracelular de agua, para esto requiere una variedad de respuestas fisiológicas, desde preventivas para la protección celular hasta la reparación de daño producido por la desecación (Billi & Potts, 2002).

La producción de ROS, derivada de la reducción de oxígeno molecular, es una inevitable consecuencia de la vida aeróbica. El equilibrio entre la producción y eliminación de las ROS puede ser afectado por diversos factores de estrés, como la salinidad, la sequía, la radiación UV, metales pesados, temperaturas extremas, deficiencia de nutrientes herbicidas, ataques de patógenos y perdida de agua (Gill & Tuteja 2010; Imlay, 2015). Estas ROS son producidas tanto en condiciones normales como en condiciones de estrés. En condiciones normales, la formación y remoción de ROS en la célula se encuentra en balance.

1.4 Especies reactivas de oxígeno y daño celular

El oxígeno es un elemento esencial de toda la vida aerobia, a su vez es un oxidante fuerte y necesario en el proceso de la respiración. Los radicales oxidantes son producidos continua e inevitablemente en los organismos aerobios, como productos de la respiración y también del metabolismo oxidativo. En la cadena de electrones existe una fuga del 1% de los electrones que reaccionan excitando al O_2.

Las especias reactivas de oxígeno (ROS) son producidas directamente por la excitación de O_2 y la subsecuente formación del singlete de oxígeno, o por la transferencia de uno, dos o tres electrones al O_2 lo que resulta en la formación de radicales superóxido, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o radicales hidroxilo respectivamente (Baker & Orlandi, 1995). Cuando las ROS se acumulan al interior de la célula, ésta puede responder y removerlas, sin embargo si las condiciones de estrés oxidante exceden la capacidad de las defensas antioxidantes de la célula, comienza a generarse daño celular afectando a moleculas como DNA, proteínas y lípidos.

El superóxido es generado cuando el oxígeno recibe un electrón proveniente principalmente de la cadena respiratoria, algunas oxidasas como la oxidasa del NADPH, la oxidasa de xantina y algunas peroxidasas inespecíficas producen O_2^-. El anión superóxido tiene la capacidad de inhibir enzimas tales como la deshidrogenasa 6-fosfogluconato, la aconitasa y la fumarasa, afectando la reducción del NAD+ y del metabolismo energético, También puede reducir el Fe (III) a Fe (II), reaccionar con el ascorbato pero no con el NADPH, DNA, lípidos ni con proteínas (Hansberg-Torres, 2002). De la misma forma, el H_2O_2 es formado cuando dos electrones son aceptados por la molécula de oxígeno y como producto de la reacción de las superóxido dismutasas (SODs).

De las ROS generadas en el interior celular, el radical hidroxilo HO^- es el oxidante más peligroso ya que reacciona con una gran cantidad de moléculas dentro de la célula. Imlay (2013), menciona el daño producido por este radical al DNA causando mutaciones o deleciones que pueden ser letales para la célula. Su formación se produce cuando el peróxido de hidrógeno reacciona con iones de hierro, en las denominadas reacciones de Fenton (ec.1) (Chen & Schopfer, 1999) y por reacciones de Haber-Weiss en presencia de O_2^- (Hansberg-Torres, 2002) (ec.2).

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + {}^{\bullet}OH + OH^- \quad \text{(Ecuación 1)}$$

$$O_2^- + H_2O_2 \longrightarrow {}^{\bullet}OH + OH^- + O_2 \quad \text{(Ecuación 2)}$$

1.5 Línea de defensa contra el estrés oxidativo

Los organismos aerobios poseen mecanismos de defensa ante el estrés oxidativo, para evitar o mitigar los daños causados por aumento en las especies reactivas de oxígeno (ROS). La primera respuesta de un organismo ante condiciones de estrés oxidativo incluye la activación de enzimas antioxidantes, el uso de compuestos antioxidantes solubles en agua y moléculas antioxidantes liposolubles (Foyer *et al.,* 1997, Noctor & Foyer, 1998). Muchas defensas bacterianas contra el estrés oxidativo están basadas en los cambios de la concentración de enzimas que degradan O_2^- y H_2O_2 o que reparan el daño causado al ADN y clusters de Hierro-Sulfuro en proteínas (Gray & Jakob, 2015).

La primera función de estas defensas antioxidantes es restringir la acumulación intracelular de las ROS (Noctor & Foyer, 2014). Las principales enzimas antioxidantes que actúan ante la presencia de las ROS son: las superóxido dismutasas (SOD) y las catalasas (Fridovich, 1998). Además existen otras enzimas que ayudan en la eliminación de las ROS, tales como la glutatión peroxidasa, L-ascorbato peroxidasas y las peroxirredoxinas (Cardenas-Rodriguez *et al.,* 2008), que son empleadas por la célula.

1.5.1 Superóxido Dismutasas

Las superóxido dismutasas (SODs) son metalo enzimas que efectúan la dismutación del anión superóxido, convirtiéndolo en oxígeno y peróxido de hidrogeno (H_2O_2), como se muestra la reacción en la ecuación (3). Estas superóxido dismutasas (SODs) son la primera línea de defensa en células expuestas a oxígeno. De acuerdo al co-factor que utilizan durante su activación, pueden ser Fe-SOD, Mn-SOD o Cu/ZnSOD principalmente (Fridovich, 1995; Kim, 1998). En su genoma *P.putida* KT2440 posee la Mn-SOD y la Fe-SOD, codificadas por *sodA* y *sodB* respetivamente (Kim *et al.,* 1999).

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2 \quad \text{(Ecuación 3)}$$

1.5.2 Catalasas y Peroxidasas

Dentro de los mecanismos antioxidantes de las células para la remoción de H_2O_2, se encuentran las catalasas. La acción enzimática de las catalasas es la descomposición del peróxido de hidrógeno a agua (ec.4) (Lushchak, 2014).

$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2 \quad \text{(Ecuación 4)}$$

Al mismo tiempo interviene la actividad de enzimas como la glutatión peroxidasa (GPXs, Iqbal *et al.,* 2006), glutation S-transferasa (GSTs; Dixon *et al.,* 2009) y peroxirredoxinas (PRXs; Dietz, 2011), las cuales además de reducir H_20_2, también utilizan como sustrato los hidroperóxidos orgánicos. Las catalasas descomponen altas concentraciones de H_2O_2 rápidamente, pero son mucho menos efectivas que las peroxidasas que remueven el H_2O_2 presente en bajas concentraciones con mayor afinidad (K_m baja) por el H_2O_2 (Kranner & Birtić, 2005).

La Glutation peroxidasa (GPX) juega un papel importante en la célula, es la encargada de reducir el peróxido de hidrógeno y lipoperóxidos, transformándolos en H_2O y alcoholes como se observa en la ecuación (5), de esta forma pasa a un estado oxidado (GSSG); a su vez puede ser reciclado por la glutatión reductasa (GR), generando Glutation reducido (GSH), utilizando como al NAPDH como sustrato (Garza, 2008).

$$H_2O_2 + 2GSH \longrightarrow H_2O + GSSG \quad \text{(Ecuación 5)}$$

Otras de las enzimas antioxidantes son las Peroxirredoxinas (Prxs) las cuales son abundantes en las células y están ampliamente distribuidas en los diferentes phyla (Manevich *et al.,* 2003; Perkins *et al.,* 2015). Estas enzimas son consideradas sensores celulares debido a su abundancia y reactividad (Nelson *et al.,* 2011). Catalizan la reacción mostrada en la ecuación (6) y pueden reducir una amplia variedad de compuestos como el peróxido de hidrógeno, peroxinitrito y diversos hidroperóxidos orgánicos (Kaihami *et al.,* 2014). Las enzimas peroxirredoxinas (Prxs) comparten el mismo mecanismo catalítico, poseen un sitio activo cisteína que es oxidado a ácido sulfénico por el sustrato peróxido (Monteiro *et al.,* 2007).

$$ROOH + 2e^- \longrightarrow ROH + H_2O \quad \text{(Ecuación 6)}$$

1-cysPrx puede reducir fosfolípidos y otros hidroperóxidos y de esta forma proteger la membrana celular ante posible daño por la acumulación de las ROS (Mundree *et al.,* 2000; Mowla *et al.,* 2002; Manevich *et al.,* 2003).

II. ANTECEDENTES

Pseudomonas putida es una bacteria Gram negativa con la capacidad de habitar diferentes ambientes debido a su metabolismo versátil, bajo requerimientos nutricionales y la sorprendente tolerancia a diversos compuestos orgánicos (Dos Santos *et al.,* 2004; Nelson *et al.,* 2002). *Pseudomonas putida* KT2440, pertenece a la familia de las *Pseudomonadaceae* y es una bacteria muy estudiada, su genoma ha sido secuenciado y reportado (Nelson *et al.,* 2002), a su vez es una cepa reconocida como no patógena por los Institutos Nacionales de Salud de EUA (Federal Register, 1982), deriva de la cepa *P.putida* mt-2, (Ramos *et al.,* 1994). Por sus características fisiológicas *P.putida* KT2440 tiene potencial para diversas aplicaciones ambientales y biotecnológicas (Santos *et al.,* 2004; Nikel & De Lorenzo, 2012; Zuo *et al.,* 2015). Se ha reportado que la cepa *P.putida* KT2440 y sus derivados sobreviven en altos números en suelos sin vegetación y en la rizósfera de plantas crecidas bajo condiciones naturales y de invernadero (Molina *et al.,* 2000). Esta bacteria además posee la capacidad de colonizar la rizósfera en una gran variedad de cultivos (Espinoza-Urgel *et al.,* 2002), por ejemplo plantas de maíz (Morales-García, 2011). Estas características hacen a *P.putida* KT244O relevante en el desarrollo de los inoculantes microbianos usados en la agricultura (Molina *et al.,* 2000).

En el Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana (LEMM), perteneciente a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla se trabaja en el desarrollo de distintas formulaciones de inoculantes microbianos, uno de ellos, descrito por Morales-García (2011), que emplea a *P. putida* KT2440 como parte de la formulación. Uno de los objetivos del LEMM es desarrollar inoculantes microbianos que puedan ser aplicados en cultivos en zonas con baja disponibilidad de agua, además de ser una alternativa al indiscriminado y excesivo uso de los agroquímicos. Aunque esta bacteria promueve el crecimiento de plantas, es sensible a desecación (Muñoz-Rojas & Ramos, 2009). Los primeros experimentos en el LEMM realizados por Muñoz-Arenas (2006), determinaron la sensibilidad de *P.putida* KT2440 a la desecación, sin embargo esta bacteria también posee estrategias de supervivencia cuando interacciona con raíces de plantas (Pazos-Rojas *et al.,* 2008; Muñoz-Arenas *et al.,* 2008) y

así mismo cuando co-interacciona con *Klebsiella variicola* T29A2 (Hernández-Canseco, 2015).

Como se mencionó con anterioridad el fenómeno de desecación promueve la formación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS), *P. putida* KT2440 ha sido estudiada con anterioridad bajo condiciones de estrés oxidativo. Comparando *P. putida* KT2440 con *E. coli* se han demostrado diferencias en la regulación genética, *E.co*li posee un regulón principal que se activa cuando sensa estrés del tipo oxidativo, denominado regulón SoxRS; estudios realizados por Park *et al.* (2006) demostraron que *P. putida* KT2440 posee la proteína SoxR, no obstante el homologo SoxS no se encuentra en su genoma, siendo estos genes regulados por otros factores transcripcionales independientes. Así mismo se ha visto que *P. putida* KT2440 puede generar una mayor cantidad de poder reductor debido al uso principal de la vía de Entdner-Dudoroff, la generación de NADPH le sirve a la bacteria para la constante regulación del glutatión y tiorredoxinas (Chavarría, 2013). La aplicación y liberación de cepas recombinantes en el medio ambiente es un tema de polémica entre la comunidad científica y la sociedad, sin embargo en el caso de *P.putida* KT2440 han sido desarrolladas y utilizadas en diversas aplicaciones biotecnológicas (Jiménez *et al.,* 2002). Recientemente se observó que bacterias recombinantes que expresan genes vegetales (*XvPer1, XvSAP1 y ALDRXv4*) son más tolerantes a desecación y salinidad, pero además son capaces de incrementar la tolerancia de las plantas con las que co-interaccionan bajo condiciones adversas de salinidad (Muñoz-Rojas & Ramos, 2009). El gen *XvPer1* codifica para la proteína 1-Cys Peroxiredoxina y le confiere a *P. putida* KT2440 una mayor resistencia a la desecación bajo condiciones de aire ambiental donde reacciones de oxidación ocurren a una mayor velocidad que en condiciones de vacío (Mundre *et al.,* 2000; Muñoz-Rojas & Ramos, 2009). El gen *XvPer1* proviene de la planta *Xerophyta viscosa* Baker (Familia Velloziaceae) una de las comunmente denominadas “plantas de resurrección” por su capacidad de tolerar desecación extrema. *X.viscosa* puede deshidratarse hasta un quedar con 5% de agua intracelular y bajo rehidratación la planta recupera sus funciones metabólicas (Sherwin & Farrant, 1998).

En el presente trabajo se evaluó el desempeño de *P. putida* KT2440 y su derivada portadora del gen antioxidante denominado *XvPer1*, para su obtención se utilizó el plásmido binario pJMR1, ver Figura 2, que fue transferido por conjugación triparental a células de *P. putida* KT2440. Ambas cepas , la parental y la derivada, fueron exploradas bajo condiciones de desecación ambiental.

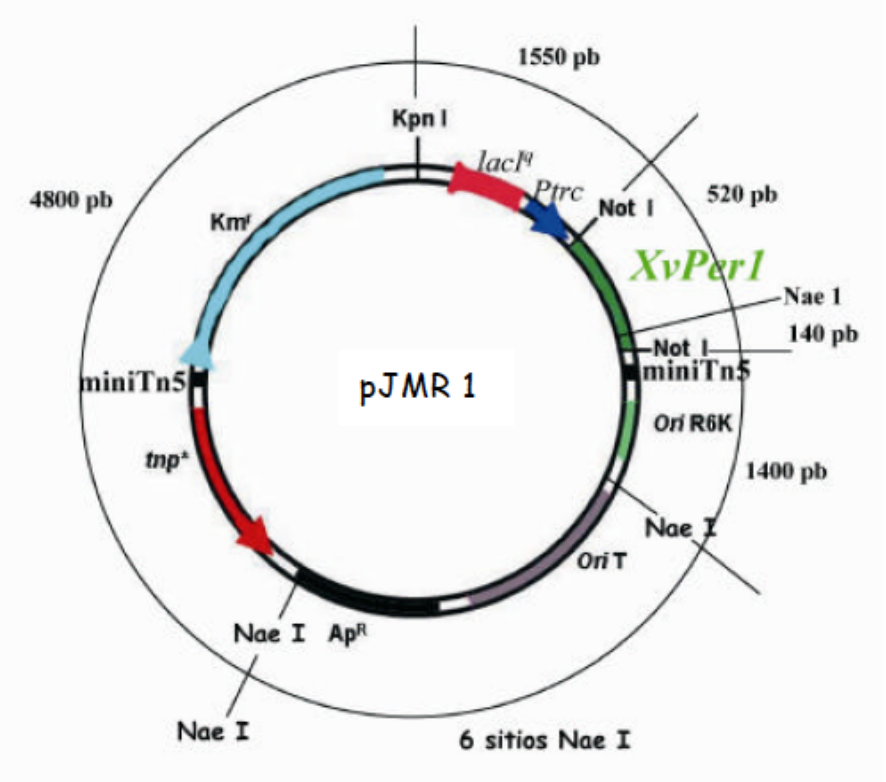


Figura 2. *Plásmido pJMR1 con el gen XvPer1 para la obtención de la cepa derivada de P.putida KT2440*

III. JUSTIFICACIÓN

Muchas zonas de cultivo en el mundo poseen características climáticas semiáridas, donde la falta de agua es una limitante al crecimiento vegetal. La aplicación de diversos compuestos químicos en la agricultura intensiva y extensiva ha provocado con el paso del tiempo el deterioro del suelo y ha se ha convertido en fuente de contaminación ambiental. La introducción de los inoculantes microbianos al mercado agrícola es una opción económicamente viable para los agricultores, sin embargo la efectividad de los inoculantes en el campo ha sido limitada por el decremento de la supervivencia bacteriana durante el periodo de anaquel hasta su llegada al campo. Diversos estudios han demostrado efectos adversos complejos a nivel celular causados por la pérdida de agua, lo que incluye daños del tipo oxidativo. Aunque se tiene conocimiento de la prevalencia de los altos niveles de ROS en los procesos que involucran escases de agua, el mecanismo molecular no está descrito ni lo están los factores que lo detonan, por lo que el presente proyecto investigará la relación de la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) durante los procesos de desecación y la supervivencia bacteriana. Con el conocimiento generado se podrán sentar las bases para plantear mejores estrategias para la producción de inoculantes más efectivos.

4. Hipótesis

La acumulación intracelular de especies reactivas de oxígeno durante la desecación, condiciona la supervivencia bacteriana.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Estudiar los efectos del estrés oxidativo en la supervivencia bacteriana durante el proceso de desecación.

5.2 Objetivos específicos

1. Cuantificar niveles de ROS y supervivencia bacteriana de *Pseudomonas putida* KT2440 y su cepa modificada con el gen *XvPer1* antes, durante y después de la desecación.

2. Analizar la expresión de los genes de *Pseudomonas putida* KT2440 y su cepa modificada XvPer1-6a que participan en la defensa contra el estrés oxidativo.

3. Estudiar la actividad enzimática de las defensas antioxidantes de la cepa silvestre y la cepa modificada antes, durante y después de la desecación.

4. Evaluar el daño global a lípidos antes y al final del proceso de desecación.

5. Integrar la información generada para proponer un mecanismo de los efectos de las ROS en la supervivencia bacteriana en condiciones de desecación.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Condiciones de crecimiento de *Pseudomonas putida* KT2440

Se utilizaron dos cepas de *P. putida* KT2440, la cepa silvestre y una cepa modificada *P. putida* KT2440 XvPer1-6a que posee un gen insertado denominado *XvPer1* que codifica para un antioxidante (1-cys peroxirredoxina). Ambas cepas se crecieron utilizando medio de cultivo Luria-Bertani (LB) (Abril *et al.,* 1989), cuyos componentes se muestran en la Tabla 1. Para la cepa silvestre se añadió al medio el antibiótico cloranfenicol a una concentración de 100 µg/ml y para la cepa modificada se le agregó al medio 100 µg/ml de cloranfenicol (cm) y 80 µg/ml de Kanamicina (km). Las cepas fueron cultivadas por tiempos de 24h a 30^{o}C en agitación, ver Figura 3.

Tabla 1. *Componentes de medio LB utilizados para el crecimiento de cepas P. putida KT2440.*

***P. putida* KT2440**	***P. putida* KT2440 XvPer1-6a**
NaCl 10 g/L	NaCl 10 g/L
Extracto de levadura 5 g/L	Extracto de levadura 5 g/L
Peptona de caseína 10 g/L	Peptona de caseína 10 g/L
100 ug/ml de cloranfenicol	100 ug/ml de cloranfenicol
	80ug/ml de Kanamicina

Figura 3. *Crecimiento de las células de* Pseudomonas putida *KT2440.*

6.2 Supervivencia de *P. putida* KT2440 en condiciones de desecación

Se llevaron a cabo experimentos bajo condiciones de desecación con la finalidad de monitorear la supervivencia de las bacterias durante un determinado periodo de estrés por la pérdida de agua intracelular, el método se muestra en la Figura 4. Las dos cepas de *P. putida* KT2440 se cultivaron con las condiciones ya mencionadas. Primero fueron cultivadas 16 h en un pre inoculo de 10 ml, posteriormente se transfirieron a un matraz con 30 ml de medio LB ajustando la densidad óptica (D.O, determinada a una longitud de onda de 600nm) igual a 0.05, para ser cultivadas por 24 h a 30°C. Una vez que las cepas alcanzaron una DO superior a 4 (600 nm), se realizó el lavado de las células con agua estéril, centrifugando a 6000 rpm x 8 min. Después del lavado, el paquete celular se resuspendió en agua esteril con el mismo volumen inicial. El siguiente paso fue distribuir la suspensión bacteriana (30 ml) en alicuotas en tubos de polipropileno con 500 µl de volumen cada uno, tapándolos con algodón estéril y colocándolos en una incubadora a 30°C con humedad relativa de 50%. Durante los experimentos se monitoreo el número de Unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) utilizando el método de Goteo en Sellado por Placa en Masivo (GSPM) (Corral-Lugo *et al.,* 2011), realizando, el primer sellado en placa multipozos previo al estrés, para conocer el número de UFC/ml iniciales (T0). Los siguientes conteos realizados en el experimento fueron cada 72 h por 18 días, con rehidrataciones rápidas (20 min) previo al conteo.

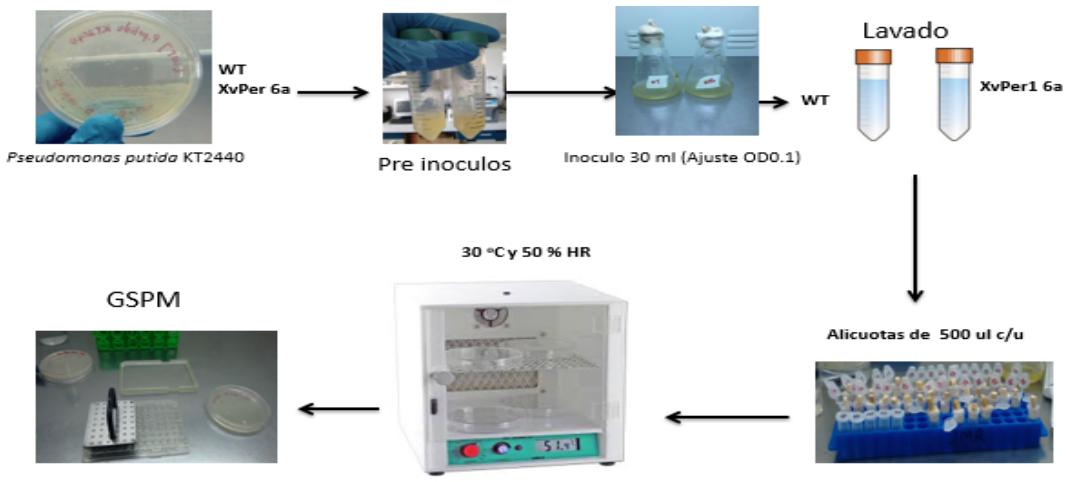


Figura 4. *Diagrama de experimento de desecación.*

6.3.1 Número de UFC/ml y BSR antes y después de la desecación

La tasa de supervivencia bacteriana (BSR, por sus siglas en inglés) se define como la relación del logaritmo del número de células bacterianas presentes en la suspensión después de la desecación (D.D), respecto al logaritmo del número de células viables antes de la desecación (A.D) multiplicada por 100. La ecuación 7 la describe.

BSR= [(Log (UFC/ml D.D.+1))X100/(Log UFC/ml A.D)] (Ecuación 7)

El número de UFC/ml al inicio y final del experimento de ambas cepas de *P. putida* KT22440 se obtuvo utilizando el método de GSPM (Corral-Lugo *et al.,* 2011) en el cual en cada sellado se utilizaron cinco réplicas, la primera del día 0 (antes de la desecación) y las de los monitoreos, células previamente rehidratadas con agua destilada por 20 minutos, a los 3, 6, 9, 12, 15, 18 días después de la desecación

6.4 Medición de las especies Reactivas de Oxígeno intracelular

Para realizar la cuantificación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares, se utilizó el kit Cell Biolabs OxiSelect Intracellular ROS Assay (Green Fluorescense), el cual está diseñado para medir actividad de hidroxilo, peróxido u otras especies reactivas de oxígeno en el interior de la célula. Este KIT utiliza un fluoróforo denominado 2',7'-Diclorohidrofluoroceína diacetato (DCFH-DA) que permea la célula, se difunde a través de la misma y es de-acetilado por acción catalítica de las esterasas generando 2',7'-Diclorohidrofluoroceína (DCFH), mismo que es oxidado rápidamente a 2',7'-Diclorohidrofluoroceína (DFC) por las ROS como se observa en el la Figura 5. La señal de la intensidad de fluorescencia es proporcional a los niveles de especies reactivas de oxígeno en la célula.

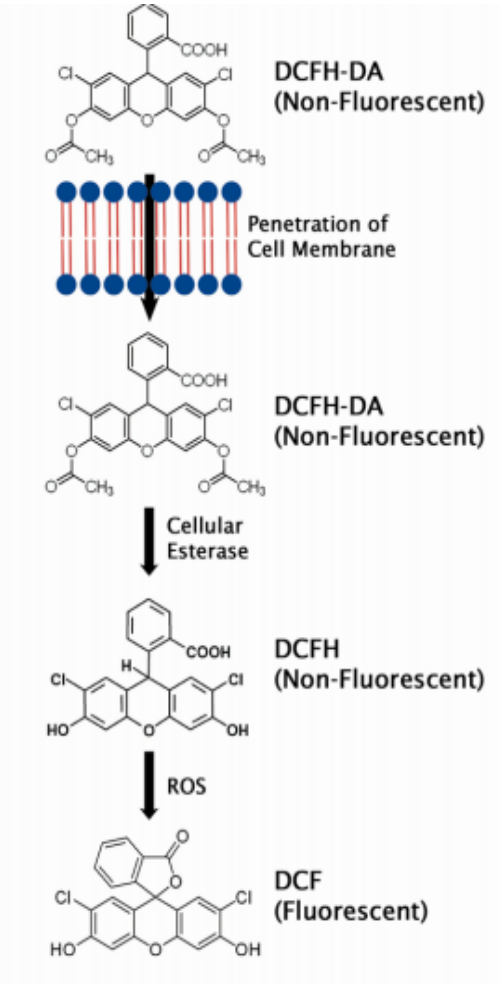


Figura 5. *Mecanismo para medición de ROS intracelular. Cell Biolabs OxiSelect Intracellular ROS Assay KIT (Green Fluorescense).*

El experimento para la medición de las ROS intracelulares se realizó haciendo monitoreos durante los días 0, 6, 12 y 18 después de la desecación. Para realizar el ensayo las muestras fueron rehidratadas por 20 minutos antes de cada medición de las ROS. Se tomaron tres tubos al azar de cada cepa que se encontraban en desecación, se siguió el protocolo del fabricante, dichas muestras fueron centrifugadas a 8,000 rpm x 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se les añadió la mezcla de agua, el reactivo DMSO y del fluoróforo (DCFH-DA) en un volumen total de 300 µl todas las muestras fueron incubadas por un tiempo de 1 hora y 30 minutos a 37°C en total oscuridad para evitar la degradación del fluoróforo. Posteriormente las muestras fueron lavadas para remover el fluoróforo del medio, se resuspendieron en 500 µl de agua y se rompieron por sonicación.

Finalmente las lecturas de fluorescencia se realizaron utilizando una placa de 96 pozos en un fluorímetro, cada muestra se colocó por triplicado y se midió la emisión a una longitud de onda de 525 nm.

6.5 Medición de Actividad de las SOD

Se calculó y determinó la actividad superóxido dismutasa de las cepas durante el periodo de desecación a los días 0, 6, 12 y 18. Utilizando el kit 19160 SOD determination (Sigma-Aldrich), que se basa en la formación del colorante formazán hidrosoluble tras la reducción con un anión superóxido. La tasa de reducción del O_2 está linealmente relacionada con la actividad de la xantina oxidasa (XO) que es inhibida por las SOD (Figura 6).

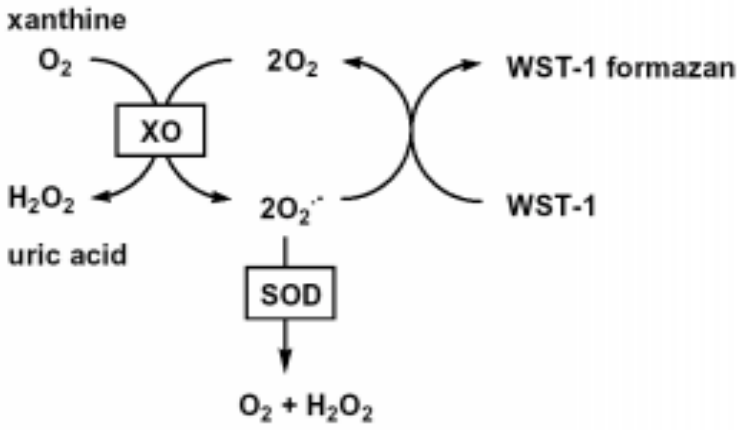


Figura 6. *Principio del ensayo SOD. 19160 SOD determination KIT (Sigma-Aldrich).*

Para el experimento se tomó un tubo de cada muestra sometida a desecación, se rehidrataron las células por 20 minutos, se homogenizaron y se sonicaron en hielo con amplitud de 40% y pulsos de 10 s (x4). Posteriormente se centrifugaron a 8,000 rpm x 8 minutos, y se trabajó con el sobrenandante (siempre en hielo). Se utilizó el protocolo sugerido por el fabricante del kit. Como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. *Diseño experimental SOD.*

	Muestra	**Blanco 1**	**Blanco 2**	**Blanco 3**
Muestra	20 µl		20 µl	
H_2O destilada		20 µl		20 µl
Solución WST	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Enzima WS	20 µl	20 µl		
Buffer			20 µl	20 µl

El experimento se realizó colocando triplicados de cada muestra para la medición, y los datos fueron analizados con la ecuación sugerida por el fabricante (ecuación 8) y se calculó con las mismas muestras la cantidad de proteínas totales por el método Bradford. Las muestras para la actividad enzimática se midieron en un espectrofotómetro de microplacas a una longitud de onda de 450 nm.

Actividad SOD (% de inhibición)= {[(B1-B3)-(Muestra-B2)]/(B1-B3)} x 100/Proteínas totales. (Ecuación 8)

6.6 Cambios de Expresión en Genes de defensa ante estrés oxidativo

Se realizó la cuantificación de la expresión genética bajo condiciones de desecación utilizando la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR), Este método se basa en el aumento de la señal de fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de DNA producido por cada ciclo de PCR (Nolan *et al.,* 2006). Se analizaron diferentes genes de *P. putida* KT2440 previamente reportados asociadados a condiciones de estrés oxidativo.

6.6.1 Extracción de ARN total

Se realizaron extracciones de ARN total utilizando el método ácido fenol-cloroformo caliente, en los días 0, 6, 12, 18 del experimento. En cada uno de estos días se extrajo el ARN de tres tubos para cada cepas, rehidratando cada muestra por 20 min, se calentó el ácido fenol cloroformo a 65^{o}C x 15 min antes de comenzar la extracción, a cada muestra se

le retiró el sobrenadante y al botón celular se añadieron 500 µl de buffer de lisis al botón celular, las muestras fueron homogenizadas, posteriormente se le añadió 500 µl de fenol cloroformo caliente y se incubaron por 10 min a 65°C. Se obtuvieron dos fases, tomando con cuidado la fase acuosa y transfiriéndola a tubo nuevo, agregando nuevamente 500 µl de fenol caliente. Este paso se realizó dos veces con cada mustra. El sobrenadante obtenido se le añadieron 500 µl de alcohol isoamílico similar al paso anterior, el sobrenadante obtenido se resuspendió con 2.5 volúmenes de etanol absoluto (grado molecular) por 24 h a -80°C. Se realizó centrifugación del producto a 14,000 rpm y se retiró el alcohol del tubo, a continuación se añadieron 400 µl de etanol 70% (grado molecular) y al final la muestra de ARN se resuspendió con agua DEPC y se conservó a -80°C hasta su uso.

6.6.2 Purificación de RNA

La cantidad de ARN obtenidas de las muestras del paso 6.6.1 fueron cuantificadas espectrofotométricamente con un equipo NanoDrop2000 (Thermo Scientific™) para determinar la concentración de RNA. El DNA genómico remanente en la muestra se eliminó con el Turbo DNA Free KIT de Invitrogen. En la Tabla 3 se muestran las cantidades utilizadas.

Tabla 3. *Kit para remover ADN genómico.*

Material	Cantidad
RNA muestra	10 µl
Enzima DNAse	2 µl
Bufferx10	5 µl
H_20 libre de nucleasas	34 µl
DNAse inactivation reagent	5 µl

En el primer paso, se tomaron 10 µl de ARN de la muestra de cada cepa agregándole 34 µl de H_20 tratada libre de RNAsas, 5 µl de buffer 10X y 2 µl de la enzima DNAse del kit. Las muestras se incubaron las muestras por 25 minutos a 37 °C. Posteriormente se añadió a cada muestra la DNAse inactivation reagent en 0.1 volumenes (5 µl) de la reacción, en este paso las muestras fueron incubadas 5 minutos a temperatura ambiente, agitándolas

periódicamente por inversión. Las muestras se centrifugaron 1.5 min a 13,000rpm y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo.

6.6.3 Reacción en Cadena de la polimerasa Cuantitativa en tiempo real (RTqPCR)

Una vez removido el DNA genómico remanente en las muestras de ARN (6.6.2), se procedió a la síntesis del cDNA de ambas cepas, utilizando el kit SCRIPT cDNA synthesis de Jena Bioscience, el cual utiliza retrotranscriptasa que sintetiza cDNA a partir de RNA, y se agregaron a la reaccion los oligos reversos de los genes de interés, Tabla 4, obteniendo reacciones finales de 20 µl. Posteriormente se realizó la cuantificación de la expresión de los genes mostrados en la Tabla 4 mediante la técnica de RTqPCR, se eligió como gen "housekeeping" o de referencia a *rpoN* (Follonier *et al.,* 2013). Se utilizó SYBR Green master mix rtPCR de Applied Biosystems para la preparación de la mezcla, los volúmenes de las reacciones de las muestras fueron de 20 µl. Se realizaron diluciones para cargar 10 ng de cDNA, los oligonucleótidos fueron diluidos a 6 µM para agregarlos a la reacción. El análisis de los datos obtenidos se realizó con el método $2^{-\Delta\Delta c_T}$ que se basa en la comparación en los cambios de expresión entre dos condiciones (Livak *et al.,* 2001), en nuestro caso antes (AD) y después de la desecación (DD) (ec9).

$\Delta\Delta C_T$= [(C_T gen de interés- C_T control interno)DD - (C_T gen de interés- C_T control interno)AD)] (Ecuación 9)

6.6.4 Oligonucleótidos específicos de genes involucrados en la defensa ante estrés oxidativo de *Pseudomonas putida* KT2440

Estudios previos de Kim & Park (2014) han descrito numerosos genes en *P. putida* KT2440 que están implicados en la respuesta al estrés oxidativo. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar algunos de esos genes, mediante la técnica de RTqPCR utilizando la herramienta informática de la compañía Integrated DNA Technologies en la cual se ingresaron las secuencias de los genes y se generaron los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 4. Para el diseño, se siguió el protocolo sugerido en el programa del servidor.

Tabla 4. *Oligonucleotidos utilizados para el análisis por RT-qPCR.*

Gen	Producto	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
sodA	Superoxido dismutasa	ATTGCCATACGCCTACGAT	TTGAGGCCGTTCACGTAAG
sodB	Superoxido dismutasa	CTACTACATCGACTACCGCAAC	GAAGGTCTTGCCTTCGAACT
KatA	Catalasa	CTTCATTCGCGACCCACTTA	GACCAGAAGTCCCACATCATC
KatB	Catalasa	TATGAGCGTGGAGTGGAAAC	GAACCGAACACCAGATCTACC
trxB	Tiorredoxina	CACCTGTGACGGTTTCTTCTAC	TCACTTTGCTGGCGATGTT
ahpC	Peroxirredoxina	GACACCCACTTCACTCACAA	GTCGAAGTTGCGCGAAATG
Zwf-1	6GP	GGTTTACCGCATTGACCATTAC	TTCTGGTTCCACTGGGTTTC
oprH	Porina	GCCGCTACTACATGACCTATG	CCGAACAGCTTGGTGGTAT
fpr	ferroxirredoxina	TTCGCCAAACTGGGAAGAG	GATCTCATCGCCTTCCTTCAG
fumC-1	Fumarato hidratasa	ACATCATTCCGACCACCATC	TGTACTTGTGCCGACTTGAC
mutL	Proteína mismatch de DNA	GCAGCTCAAGGGTATCTACATC	CTTGAGGCGCTCGTACATTAT
mutS	Proteína mismatch de DNA	CACCCACTACTTCGAACTGAC	GGAACACGATGCGTTCATTG
XvPer1	peroxirredoxina	CACCACCGAACTTGGAAAGA	TGTACATCGTCGCAGGAAAG
16S	16sRNA	TGTGAAGAAGGTCTTCGGATTG	CAGAGTTAGCCGGTGCTTATT
rpoN	Sigma 54	CTGGTAGAACTGAACCAGGAAG	GTTGCGCATGAAGGTGTTG

6.7 Determinación del daño a membrana en *P. putida* KT2440

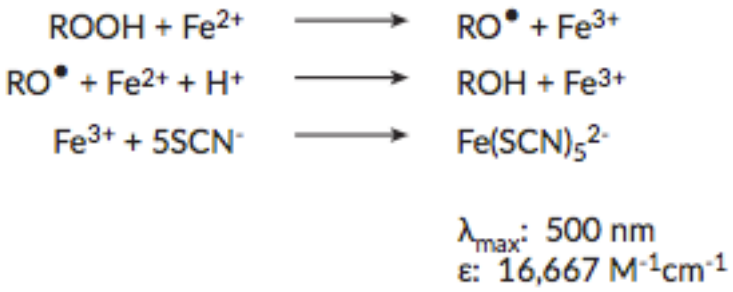
El daño a membrana se determinó por dos métodos, uno cualitativo y otro cuantitativo, ambos midiendo únicamente al día 0 y 18 del experimento. Para el primer método se utilizó The LIVE/DEAD Baclight bacterial viability kit (Thermofisher Scientific) y en el segundo el Lipid Hydroperoxide (LPO) Assay KIT de Millipore.

6.7.1 Daño a membrana por Microscopía de Fluorescencia

Utilizando The LIVE/DEAD Baclight bacterial viability kit (Thermofisher Scientific) se observó daño a membrana en las células de la cepa silvestre y de la modificada XvPer1-6a. Para realizar el ensayo, ambas muestras fueron rehidratadas por 20 min (500 µl) y se les adicionaron 700ul de la mezcla de SITO 9X y ioduro de propidio del The LIVE/DEAD Baclight bacterial viability kit (Thermofisher Scientific), el primero permea la membrana de todas las células en la muestra, tiñéndolas de verde intenso, mientras el segundo penetra las células dañadas uniéndose a los ácidos nucleicos y opacando la fluorescencia del SITO 9X y emitiendo un rojo intenso. Se incubaron en oscuridad por 10 minutos y se colocaron 5 µl de muestra en portaobjeto, las observaciones se hicieron con el objetivo 100 X en un campo espectral de aproximadamente (400-700nm).

6.7.2 Cuantificación del daño a membrana por lipoperoxidación

La cuantificación de la peroxidación de lípidos en membrana se realizó con el uso del Lipid Hydroperoxide (LPO) Assay KIT de Millipore. El fundamento de este KIT colorimétrico se basa en la medición de los hidroperóxidos que por su alta reactividad, reaccionan con los iones ferrosos para producir iones férricos, que son detectados usando el tiocianato, como se muestra en la ecuación 10. Para desarrollar este experimento se midieron muestras de ambas cepas en los días 0 y 18 del monitoreo. Se utilizaron tres tubos de cada cepa en los días de medición, para este ensayo se rehidrataron las muestras con agua grado HPLC, los tres tubos de cada cepa se juntaron en uno solo y se dejaron a un volumen de trabajo de 600 µl, estas muestras fueron sonicadas con las siguientes condiciones; tres ciclos de 10 segundos con 40% de amplitud.



(Ecuación 10)

A continuación se les agregó a cada muestra una mezcla equivalente en volumen de metanol-cloroformo, se homogenizaron y se centrifugaron para separar las fases. Se obtuvo con cuidado la fase orgánica donde se encontraba la parte lipídica de las muestras. Se transfirieron 500 µl de la extracción anterior y se añadieron 450 µl de metanol-clofororormo (2:1). Se añadieron 50 µl de la mezcla de los reactivos FTS1 y FTS2 del kit los cuales funcionan como cromógenos de la reacción. Cada muestra se colocó por triplicado en la placa multipozos, incubadas por cinco minutos a temperatura ambiente, finalmente se midió a 500 nm. Además se construyó una curva estándar para conocer la concentración de hidroperoxidos por muestra, esto utilizando la Solución estándar que proporcionó el fabricante.

7. RESULTADOS

7.1 Determinación de la BSR

Los experimentos de desecación realizados mostraron los siguientes resultados en la supervivencia de las dos cepas estudiadas de *Pseudomonas putida* KT2440 (cepa silvestre y cepa modificada con el gen XvPer1-6a). En el primer experimento desarrollado se sometieron a desecación ambas cepas en dos fases de crecimiento, la fase exponencial y la estacionaria, los resultados se muestran en las figuras 6 y 7, respectivamente.

En la figura 7 no se observa diferencia en la tolerancia a-desecación entre la cepa silvestre y la modificada con el gen *XvPer1* cuando se parte de la fase exponencial de crecimiento. Ambas cepas fueron recuperadas en placa hasta el día 6 después de la desecación, en este día bajo estrés por la pérdida de agua ambas cepas registraron una caída en la BSR muy similar. En los día 9 y 12 después de la desecación ya no se observó crecimiento en placa, la BSR fue de 0.

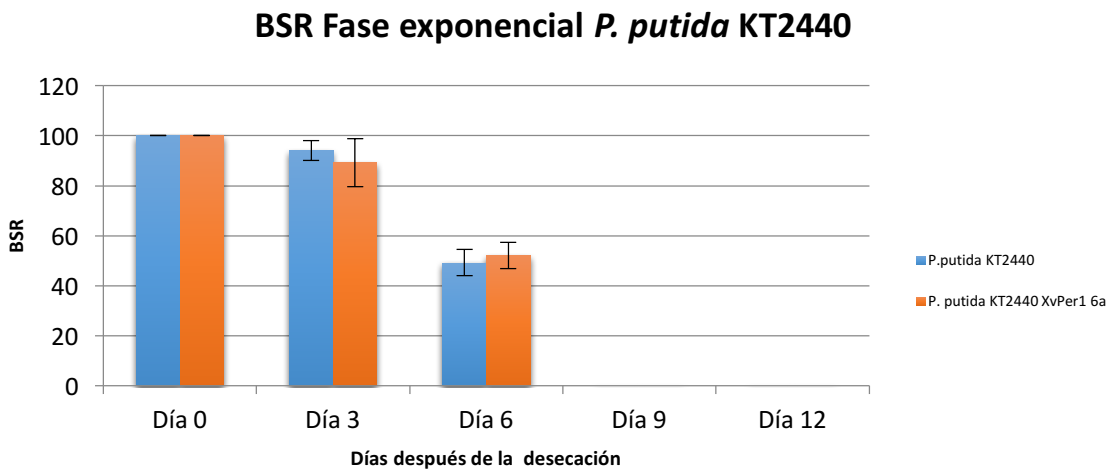


Figura 7. *Experimento de desecación partiendo de bacterias en fase exponencial de las cepas de Pseudomonas putida KT2440.*

Lo siguiente fue analizar la supervivencia bacteriana a partir de bacterias que se encontraban en la fase estacionaria de crecimiento, del mismo cultivo en crecimiento utilizado primer experimento esperamos a alcanzar la fase estacionaria, los resultados se observan a continuación en la Figura 8.

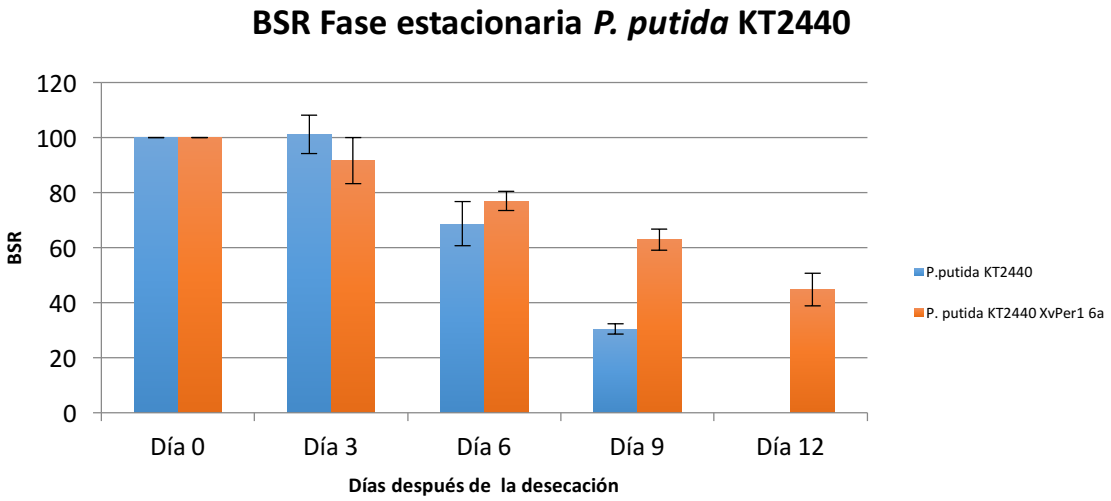


Figura 8. *Experimento de desecación con bacterias crecidas hasta la fase estacionaria de las cepas de Pseudomonas putida KT2440.*

Las cepas fueron sometidas a desecación cuando se encontraban en la fase estacionaria de crecimiento y mostraron diferencias en la supervivencia, la cepa silvestre se encontró en placa hasta el día 9 con un valor de BSR de 30.4, mientras la cepa modificada (XvPer-1 6a) mostró una mayor tolerancia a la desecación, ya que su BSR en el mismo día fue de 62.9. La diferencia en la supervivencia fue aún más notoria, al día 12 del experimento, con una BSR de 44.76 para la cepa modificada y de 0 para la cepa silvestre.

Con estos experimentos pudimos establecer que la supervivencia bajo condiciones de desecación es mayor para bacterias que se encuentran en la fase estacionaria de crecimiento y que bajo éstas condiciones, la cepa modificada es más tolerante que la silvestre. Se realizó un posterior experimento de desecación con bacterias crecidas hasta la fase estacionaria en el cual se evaluó todos los días la supervivencia de ambas cepas para

conocer más detalladamente el comportamiento de la BSR. En la figura 9 se observan los resultados obtenidos en dicho experimento.

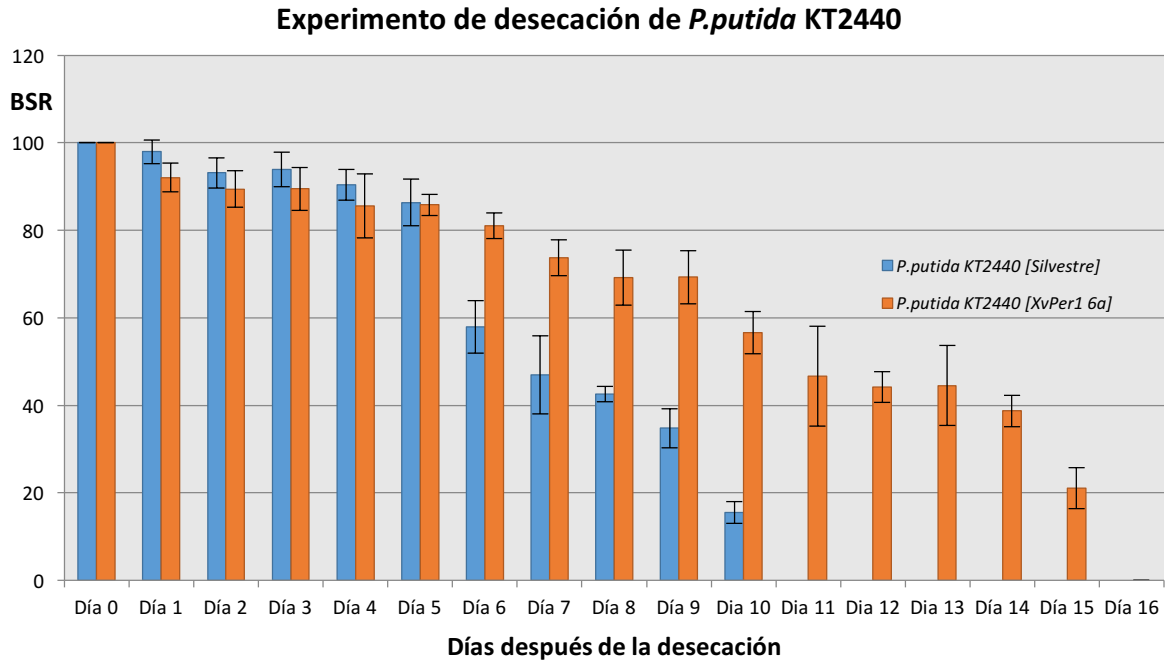


Figura 9. *Monitoreo diario de la BSR en Pseudomonas putida KT2440 cepa silvestre y modificada bajo condiciones de desecación.*

En este experimento se partió con un número de bacterias $1.25x10^9$ UFC/ml y $7.7x10^8$ UFC/ml para cepa silvestre y la cepa modificada con el gen antioxidante respectivamente. Hasta el día 4 después de la desecación, la cepa silvestre mostró una BSR ligeramente mayor a la de la cepa XvPer1-6a, para el día 5, la cantidad de agua en el tubo era mínima, y la BSR de ambas cepas fue similar, de 85 para la cepa modificada y 86 para la silvestre. Sin embargo, al día 6 se observó una disminución abrupta de la BSR de la cepa silvestre, bajando su BSR a un valor de 57.96, mientras el valor de la BSR en la cepa modificada disminuyó mínimamente a 81.08, el análisis estadístico con la T-Student mostraron cambios significativos (>0.05) en la supervivencia entre ambas cepas a partir de este punto de medición. El último conteo en placa que se pudo realizar de la cepa silvestre en este experimento fue al día 10 después de la desecación, su BSR fue de 15.48. La cepa modificada extendió su supervivencia en el periodo de desecación hasta el día 15, con valores de la BSR de 21.05, que fue el último monitoreo donde fue detectable en placa, se continuó el

monitoreo de ambas cepas hasta el día 18, día en el que la BSR de las dos cepas fue igual a 0. Con este experimento de supervivencia bacteriana pudimos corroborar que la cepa modificada XvPer1-6a es más tolerante a la desecación que la cepa silvestre.

A través de una regresión lineal se estableció la velocidad de descenso de la BSR por día en ambas cepas. La población bacteriana en la cepa silvestre desciende dos veces más rápido por día en relación a la cepa modificada, los resultados se muestran en las siguientes Figuras 10 y 11, respectivamente.

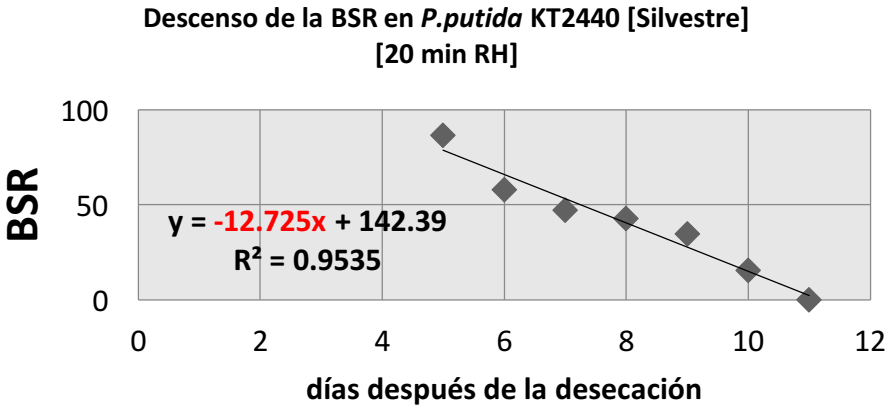


Figura 10. *Regresión lineal de la disminución de la BSR de la cepa silvestre durante la desecación.*

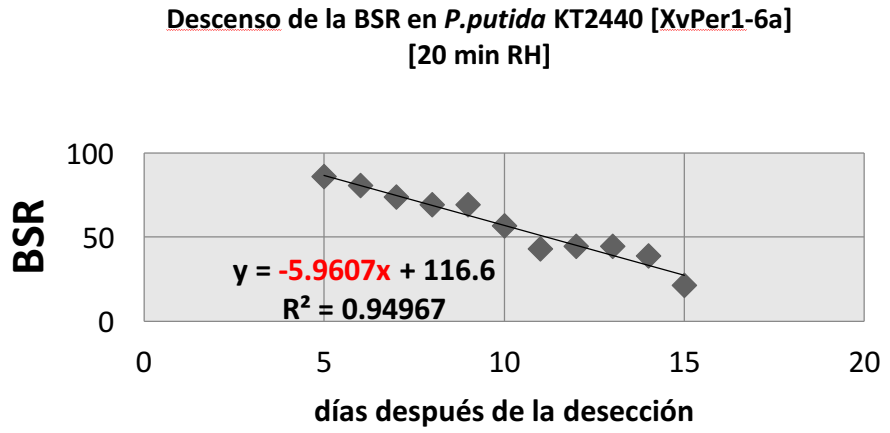


Figura 11. *Regresión lineal de la disminución de la BSR de la cepa XvPer1-6a durante la desecación.*

7.2 Cuantificación de las ROS intracelulares

Una vez determinada la supervivencia a desecación de las dos cepas de estudio, se realizó la medición de las ROS intracelulares. Durante un periodo de 18 días bajo condiciones de estrés hídrico la bacteria *P.putida* KT2440 (Silvestre) acumuló en su interior mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) que la cepa modificada XvPer1-6a, se tomaron 4 puntos de medición en el experimento, se cuantificaron las ROS al día 0 como referencia antes del estrés, y los siguientes días de monitoreo fueron 6, 12 y 18. El cálculo para la cuantificación de las ROS se realizó analizando la señal de fluorescencia emitida por el fluoróforo (DFC) entre el número de unidades formadoras de colonias más uno (UFC)+1, esto último con el objetivo de no tener una indeterminación en el caso de a la ausencia de UFC/ml. Previo al ensayo, las células fueron rehidratadas durante 20 minutos. Los resultados de la cuantificación de las ROS son mostrados en la Figura 12 y sugieren la estrecha relación que tiene el aumento de las ROS al interior celular con la supervivencia *Pseudomonas putida* KT2440 en condiciones de desecación. El kit utilizado en este experimento mide de forma general la acumulación de las ROS, lo cual no nos permitió conocer específicamente cuál especie reactiva fue la que más se acumuló al interior de las células durante la desecación.

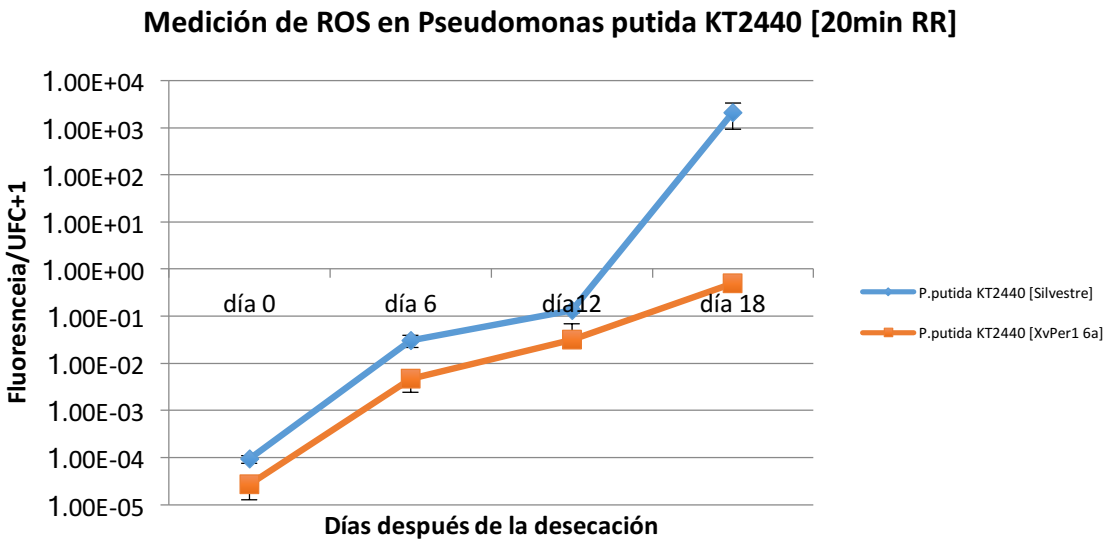


Figura 12. *Cuantificación de las Especies Reactivas de Oxígeno durante la desecación.*

7.3 Actividad Total de las SOD

Se evaluó la actividad de las enzimas superóxido dismutasas durante 18 días en condiciones de desecación, estas enzimas son las primeras en actuar ante la generación de las ROS, específicamente del anión superóxido. Se analizó la actividad de las SODs a los días 0, 6, 12 y 18, el kit utilizado se basa en un método colorimétrico que mide la inhibición de la formación de la sal de formazán. La cepa XvPer1-6a tuvo mayor actividad de las SODs que la cepa silvestre en los días analizados en condiciones de desecación. Desde el día 0 y hasta el final del experimento la actividad SOD de la cepa silvestre fue siempre menor que la registrada en la cepa modificada. En el día 6 después de la desecación ambas cepas experimentaron un incremento en la actividad SOD con respecto al día 0, la actividad de la cepa silvestre aumentó 1.93 veces, en tanto la cepa XvPer1-6a la actividad incrementó 1.55 veces, no obstante la actividad fue 20% mayor en la cepa modificada XvPer1-6a en este punto de medición. Durante los siguientes dos puntos de medición, días 12 y 18 la actividad de las SODs disminuyó notablemente en ambas cepas respecto al día 6; pero el decremento fue más marcado en la cepa silvestre llegando a valores por debajo de los iniciales. En tanto que la cepa modificada siempre mantuvo actividades por arriba de las iniciales. Figura 13.

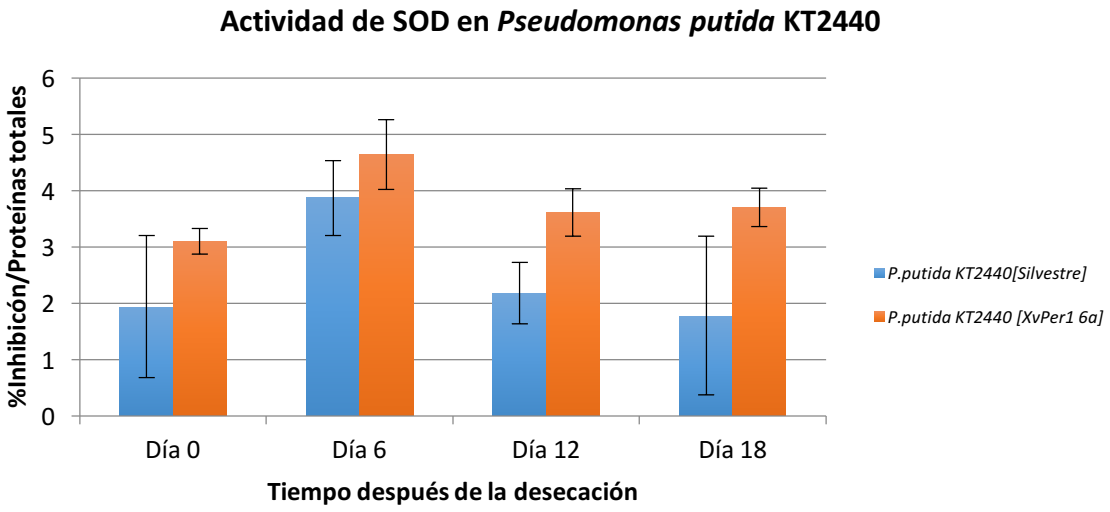


Figura 13. *Medición de la actividad enzimática Superóxido dismutasas bajo condiciones de desecación.*

7.4 Análisis de la Expresión genética en condiciones de desecación

Se realizó el análisis de la expresión genética en ambas cepas de *Pseudomonas putida* KT2440 bajo condiciones de desecación, primeramente se evaluó la expresión del gen *XvPer1*, un gen antioxidante proveniente de la planta de resurrección *Xerophyta viscosa* y que se encuentra insertado en el genoma de la cepa modificada de *P.putida* KT2440, este gen codifica para una cys-1 peroxirredoxina con actividad peroxidasa (Mundree et al. 2000). La expresión de este gen incrementó al día 6 y 12 de desecación, se registró un aumento de 3.3 y 2.8 veces respecto al día 0 (Figura 14). Para este experimento se realizaron ensayos de RTqPCR analizando los niveles de expresión por el método $\Delta\Delta^{CT}$ utilizando como gen endógeno a *rpoN (*Follonier *et al.,* 2013*)*.

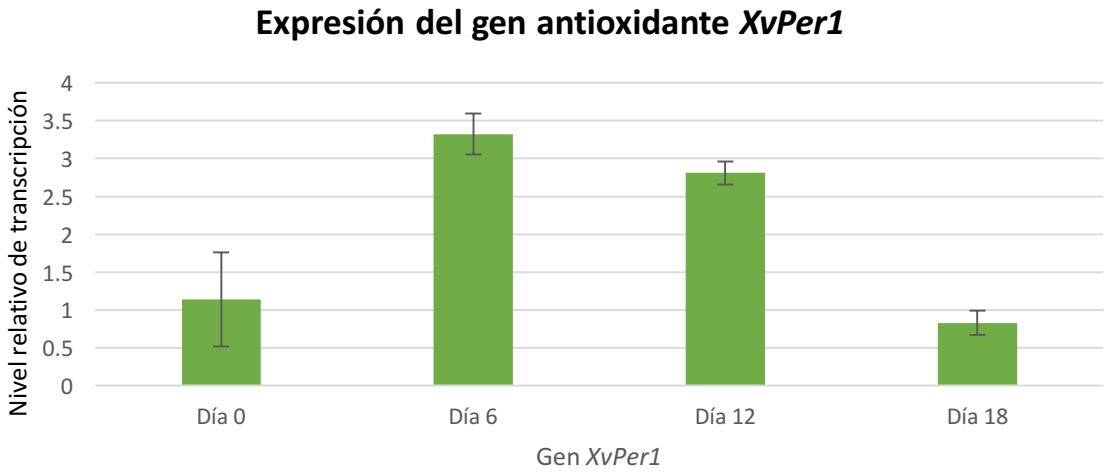


Figura 14. *Expresión del gen XvPer1 de la cepa derivada en condiciones de desecación.*

Se evaluaron los genes considerados como la primera línea de defensa ante el estrés oxidativo. El análisis se realizó en los genes *sodA* y *sodB* que codifican para las superóxido dismutasas, MnSOD y FeSOD, codificada por respectivamente. Además de las catalasas (*KatA* y *katB*). En las Figuras 15 y 16 podemos observar el comportamiento de la expresión de los genes involucrados en la defensa ante el estrés oxidativo. La Figura 15 muestra la expresión de *sodA, sodB, KatA y katB* en la cepa silvestre de *P.putida* KT2440. Se observan cambios significativos en la expresión de *sodB.* En tanto *sodA* muestra ligeros aumentos de expresión. Las catalasas que fueron evaluadas no mostraron incremento en su expresión,

al contrario disminuyeron, creando interesantemente un efecto de inhibición de los transcritos. Estos mismos genes fueron analizados en la cepa modificada de *Pseudomonas putida* KT2440, la cepa XvPer1-6a la cual no mostró cambios significativos en la expresión de los genes referidos excepto una ligera disminución en la expresión de *katA*. Los genes *sodA* y *sodB* no mostraron cambios significativos en su expresión durante condiciones de desecación, ver Figura 16.

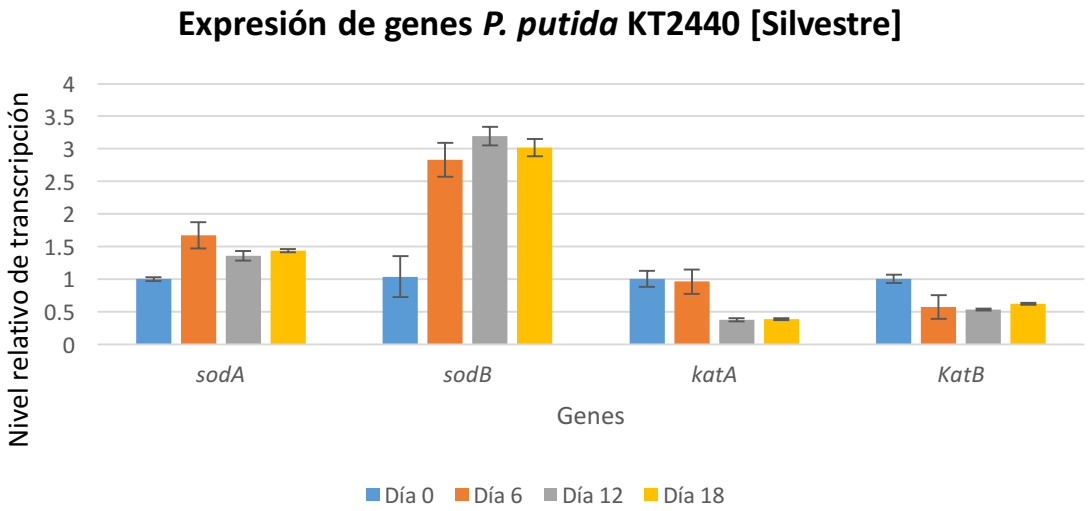


Figura 15. *Análisis de la expresión de los genes sodA, sodB, katA y katB en la cepa silvestre de Pseudomonas putida KT2440.*

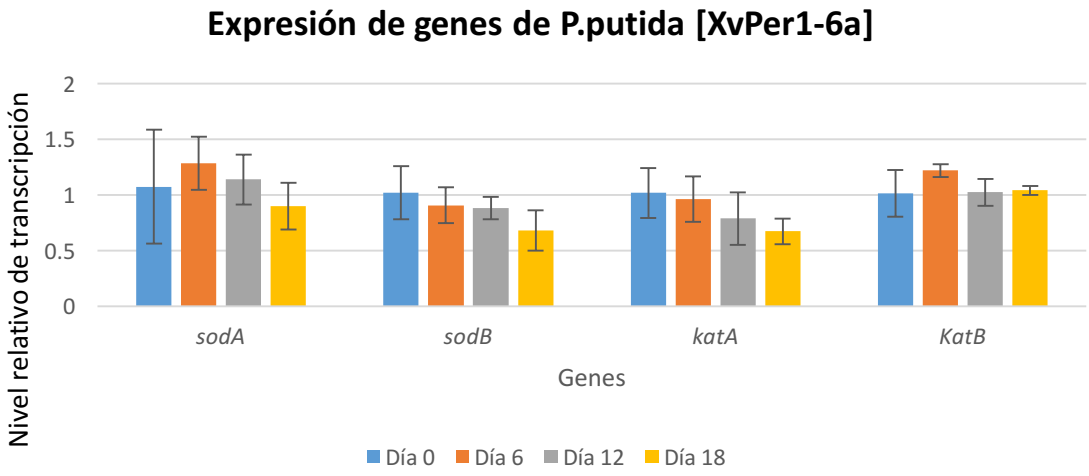


Figura 16. Análisis de la expresión de los genes sodA, sodB, katA y katB en la cepa de Pseudomonas putida KT2440 XvPer1-6a.

A continuación medimos la expresión de los genes *trxB, ahpC, zwf-1* y *fumC-1* en las dos cepas de *P.putida* KT2440. *trxB* codifica para una tiorredoxina reductasa encargada de regenerar el *"pool"* de tiorredoxinas reducidas usando como sustrato el poder reductor del NADPH, *ahpC* es una alquil hidroperóxido reductasa dependiente de TRX, *zwf-1* forma parte de la vía de las pentosas fosfatos, codifica para la enzima glucosa-6 fosfato deshidrogenasa, *fumC-1* (fumarato hidratasa) que pertenece al ciclo de Krebs y está implicada en la hidratación de fumarato a Malato, y el gen *fpr* que codifica para una ferredoxina reductasa-NADP, produciendo poder reductor para la célula, a su vez que ayuda en la protección contra el radical superóxido.

El análisis en la expresión de estos genes fue interesante, la cepa silvestre mostró cambios significativos en *ahpC* y *fumC-1*, la expresión del primero incrementó 3.93 veces en los días 12 y 18 bajo condiciones de desecación. La expresión de *fumC-1* fue gradualmente aumentando hasta alcanzar 2.72 veces, mientras que *trxB* mostró el mayor aumentó en su expresión genética en el día 6, con 2.3 veces. El gen *zwf-1* no mostró cambio en su expresión genética, los niveles de transcritos fueron similares durante todo el periodo de desecación evaluado. Sin embargo el gen *fpr* si aumentó su expresión 10.2 veces en el día 6 de desecación respecto al día 0. Posteriormente su expresión disminuye en los siguientes días del monitoreo, ver Figura 17.

La cepa modificada con el gen antioxidante (*XvPer1*) mostró ligeros cambios en la expresión de los genes de *trxB, ahpC,* y *fumC-1* bajo condiciones de desecación como se puede observar en la Figura 16. La excepción fue el gen *zwf-1* el cual se sobre expresó de manera significativa 9.5 y 3 veces en los días 12 y 18 respectivamente, sugiriendo una mayor actividad de la vía de las pentosas fosfato en esta cepa, así mismo se observó un incremento en la expresión del gen *fpr* en los días 6 y 12, disminuyendo posteriormente su expresión al final del monitoreo (Figura 18).

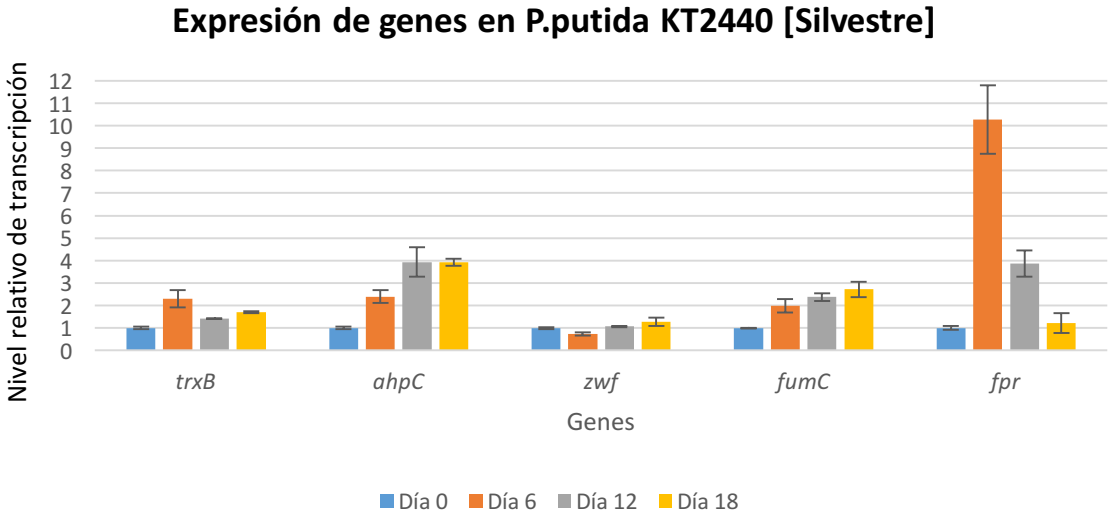


Figura 17. *Análisis de la expresión de los genes trxB, ahpC, zwf-1 y fumC-1 en la cepa de Pseudomonas putida KT2440.*

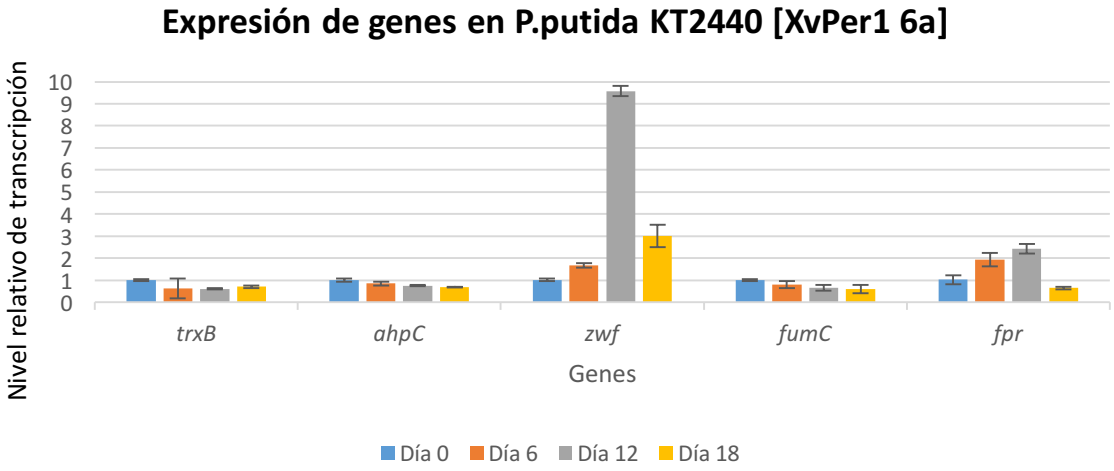


Figura 18. *Análisis de la expresión de los genes trxB, ahpC, zwf-1 y fumC-1 en la cepa de Pseudomonas putida KT2440 XvPer1-6a.*

Posteriormente se evaluó el gen *oprH,* el cual es un gen del género Pseudomonas que codifica para una porina, y es importante para el mantenimiento y soporte de la membrana bacteriana, al ser una de las proteínas mas abundantes. Como ya se sabía que la membrana es afectada durante en el proceso de desecación decidimos hacer el análisis de la expresión de este gen. Los resultados indican que este gen aumenta su expresión en diferentes

tiempos del periodo de desecación, en ambas cepas existe una expresión mayor a 18 veces, la cepa silvestre al día 6 y la cepa XvPer1-6a al día 12 después de la desecación. Esto es un indicio de que la cepa silvestre experimenta un mayor daño en la membrana en cuanto pierde por completo el agua intracelular (día 6). La cepa modificada en cambio, experimenta el mayor daño tiempo después (día 12), ver Figura 19.

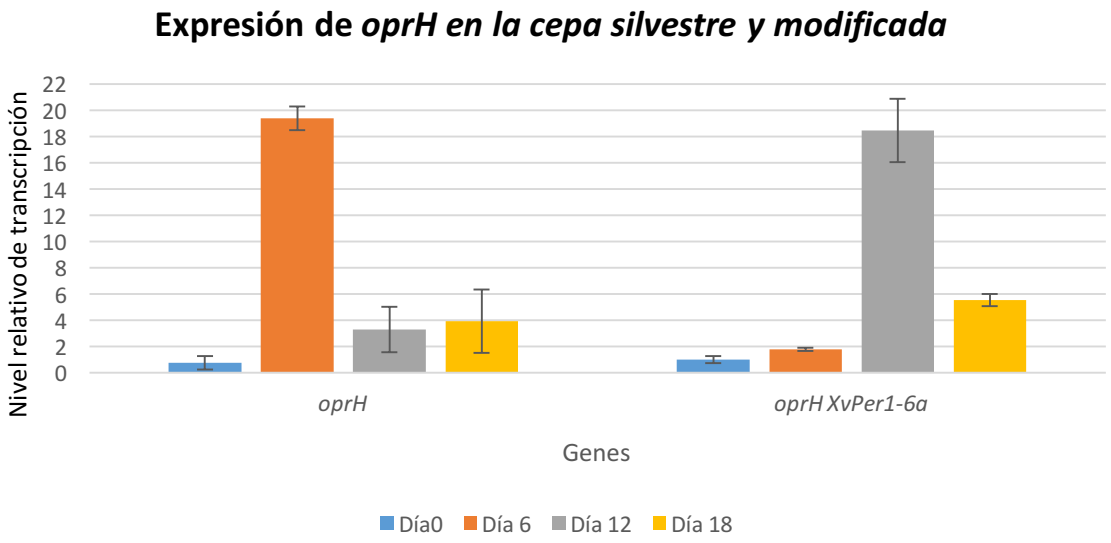


Figura 19. *Expresión de oprH durante la desecación.*

Los siguientes genes analizados fueron los involucrados en el sistema de reparación de DNA mismatch, *mutS* y *mutL* forman parte del complejo. *mutS* activa el sistema formando un dimero ($mutS_2$) que reconoce el daño o error en la secuencia de DNA. Mientras *mutL* aunque no es muy clara su función, se sabe interactúa con el dimero $mutS_2$ y una tercera proteína mutH (endonucleasa) ayudando en su activación (Acharya et al. 2003; Elez et al. 2012; Torres-Barceló et al. 2013). De acuerdo a Brierley & Martin (2013) y Ning Ding et al. (2015) señalan que el sistema mismatch no solo actúa en la replicación, sino también como parte de la señalización para prevenir daño químico como el que puede provocar las ROS principalmente los radicales OH^-. Al ser *mutS* y *mutL* parte fundamental del mecanismo de reparación de DNA, se analizó la expresión de cada uno bajo condiciones de desecación. Se observó un aumento en la expresión genética de *mutS* (2.63 veces) en la cepa silvestre al día 6 de desecación, posteriormente la expresión disminuye. Mientras *mutL* en esta misma

cepa no mostró cambios en la expresión excepto al final de la desecación que parece inhibirse su expresión. En cuanto a la cepa modificada se registró un aumento de la expresión de ambos genes sólo al día 12 de la desecación y es interesante que ambos genes se activaron durante el mismo tiempo de monitoreo (Figura 20).

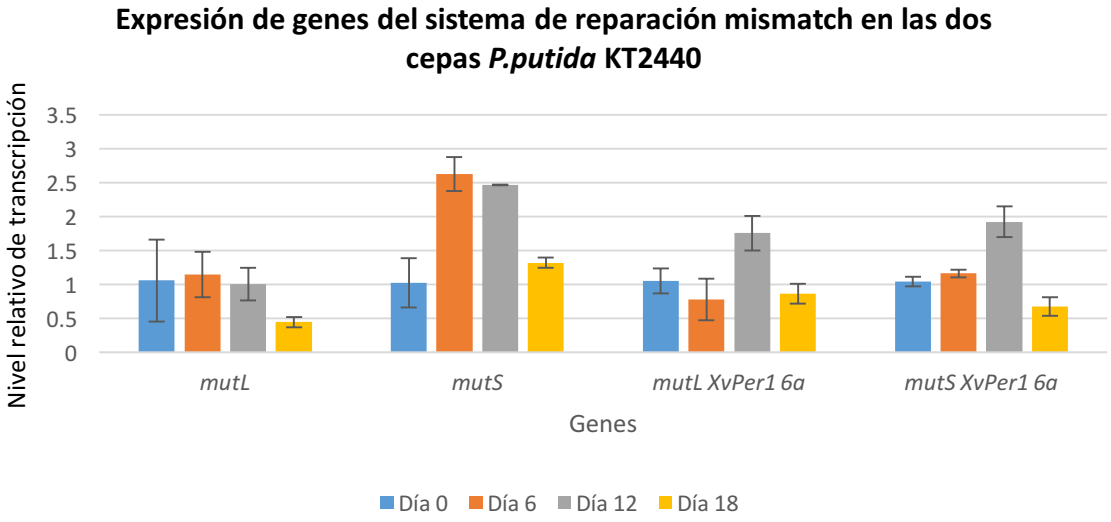


Figura 20. *Expresión de genes del sistema de reparación de DNA mismatch bajo condiciones de desecación.*

7.5 Daño a Membrana

Realizamos la medición del daño a membrana de forma cualitativa utilizando el kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability mediante microscopía de fluorescencia. A demás se utilizó el kit LPO assay kit para la medición cuantitativa del daño a membrana. Los resultados realizados por microscopía se muestran en la Figura 21. Ambas cepas de *Pseudomonas putida* KT2440 fueron monitoreadas por 18 días, durante este experimento se cuantificó la BSR. Utilizando el Kit LIVE/DEAD en el día 0, pudimos observar que la membrana de un gran número de bacterias se encuentran emitiendo una coloración verde intensa, esto, por el fluoroforo SITO 9x del kit, lo que significa que la membrana se encontraba integra, sin embargo al analizar el campo opuesto, pudimos ver que desde el día 0 existe daño a la membrana en ambas cepas, pues se observó la presencia de bacterias teñidas en color rojo (Yoduro de propidio). Aunque el número de bacterias con membranas dañadas fue mayor en la cepa silvestre.

La siguiente medición de daño a membrana la realizamos al día 18 después de la desecación y se aplicó 20 minutos de rehidratación de las bacterias previo al ensayo. La tasa de supervivencia bacteriana (BSR) de la cepa silvestre en este día 18 del experimento fue igual a 0, es decir que no pudo ser recuperada en placa; mientras que para la cepa XvPer1-6a fue de 28.04. Las células de la cepa silvestre observadas en microscopio mostraron emisión de fluorescencia débil en el campo para la emisión de luz verde al día 18. Lo interesante de este experimento fue que aunque las células de la cepa silvestre ya no son cultivables al día 18 después de la desecación, son capaces de emitir una fluorescencia mínima en un color verde-naranja. Por su parte las células de XvPer1-6a emitieron mayor fluorescencia en el campo de emisión de luz verde, sin embargo también es de notar que el color de estas fue una mezcla de verde-naranja. Como esperábamos el número de células teñidas por el Yoduro de propidio (rojo) aumentaron al final del experimento en ambos casos, con esto pudimos demostrar que el daño a membrana aumenta con la pérdida de agua.

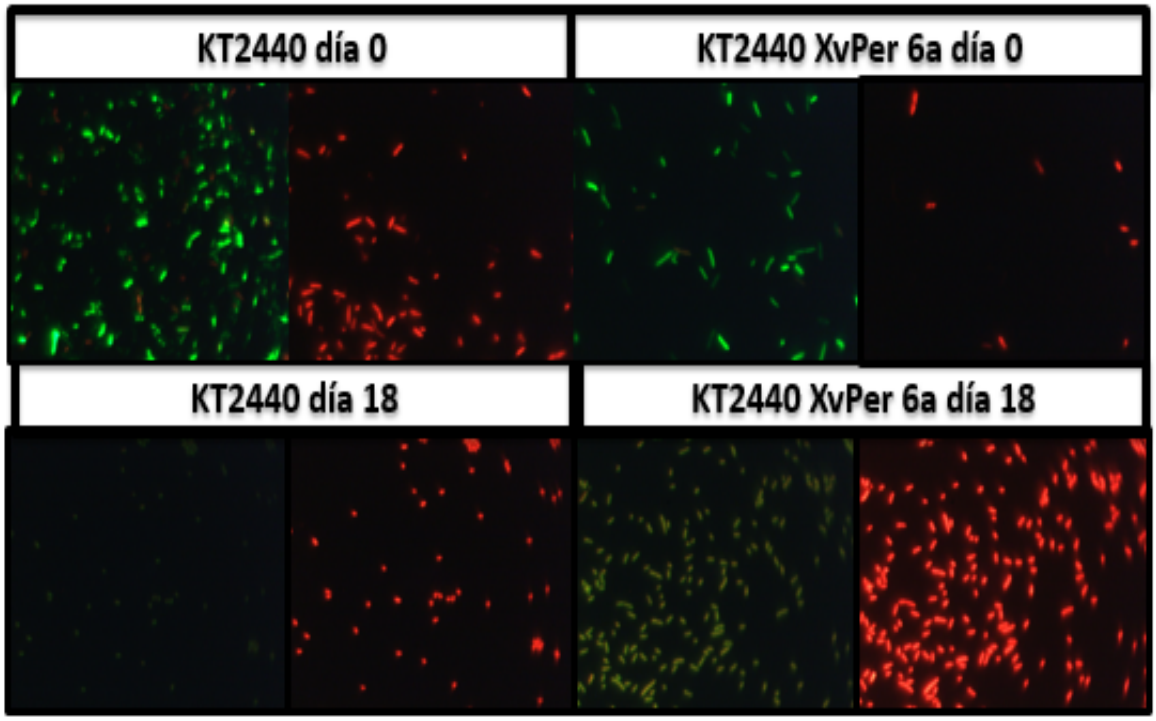


Figura 21. *Observación del daño a membrana, mediante microscopía de fluorescencia (100X) con el Kit LIVE/DEAD.*

A demás se evaluó daño a membrana en forma cuantitativa determinando la cantidad de hidroperóxidos de los lípidos. Para este experimentó se utilizó el Lipid Hydorperoxide (LPO) Assay Kit (Millipore). Los datos obtenidos se observan en la Figura 22, en la cual se calculó los nanomoles totales de hidroperóxido en cada muestra y se normalizó respecto al número de células contenido en cada muestra al tiempo cero del experimento. En esta gráfica se observó que el contenido de hidroperóxidos en los lípidos de las membranas al día 18 incrementó en un 15% en la cepa silvestre y un 4% en la cepa modificada respecto al día cero. Al realizar un análisis con la prueba T de Student el cambio en el contenido de hidroperóxidos de la cepa modificada no resultó significativo, mientras que en la cepa silvestre si lo fue.

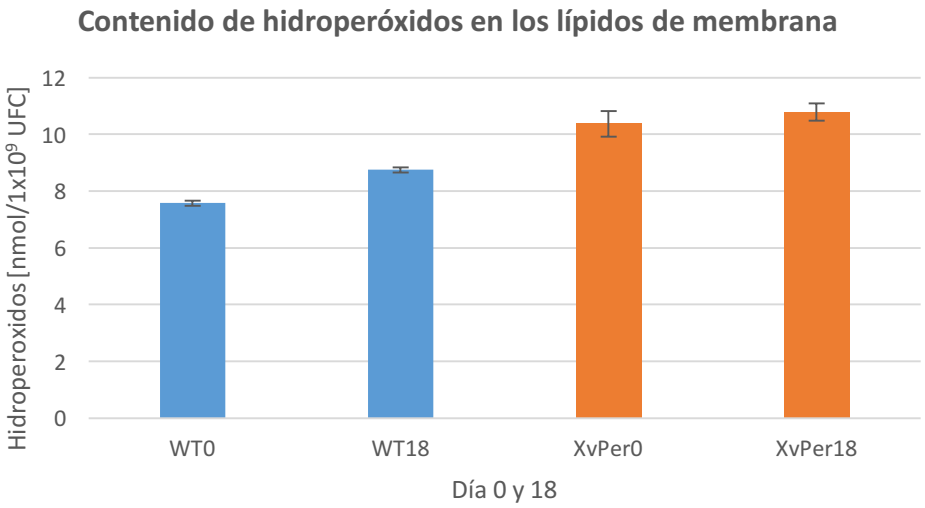


Figura 22. *Acumulación de hidroperóxidos en las cepas de Pseudomonas putida KT2440 al final de la desecación.*

8. DISCUSIÓN

Los inoculantes microbianos han sido considerados como una alternativa potencial para la sustitución del uso de los agroquímicos en los campos de cultivo, sin embargo la formulación y la transferencia tecnológica de estos sigue siendo un reto a resolver. La eficacia de los inoculantes microbianos está en dependencia de la supervivencia de los microorganismos que componen las formulaciones. La desecación es uno de los principales retos que los microorganismos aplicados en los campos agrícolas deben superar. Hay reportes que sugieren que el estrés por desecación está ligado a la generación de las ROS intracelulares, por lo que este trabajo se enfocó en estudiar estas condiciones y determinar si existe una relación directa con la supervivencia en el modelo microbiano de *Pseudomonas putida* KT2440. En este trabajo de investigación se estudiaron dos cepas de *Pseudomonas putida* KT2440 bajo condiciones de desecación. La cepa silvestre, y una cepa modificada con el gen *XvPer1* inserto en su genoma, el cual codifica para una enzima antioxidante.

Los experimentos desarrollados generaron información relevante relacionada con el estado redox intracelular, la formación de las ROS y su efecto sobre la supervivencia de *P. putida* KT2440 bajo condiciones de desecación. En los primeros experimentos realizados se exploró la supervivencia de las dos cepas de estudio en dos fases del crecimiento, la fase exponencial y estacionaria; cuando estas cepas fueron sometidas a desecación desde la fase exponencial (6 h aproximadamente) (Figura 7), no hubo diferencia en la supervivencia de las bacterias, ambas cepas solo pudieron recuperarse en placa hasta el día 6 del experimento. Cuando las bacterias fueron sometidas a desecación desde la fase estacionaria se observó una mayor supervivencia de la cepa XvPer1-6a (Figura 8). El que las bacterias en fase estacionaria fueran más tolerantes a la desecación concuerdan con lo reportado por Muñoz Rojas *et al.,* (2006).

Los experimentos de supervivencia demostraron mayor tolerancia a la desecación por parte de la cepa modificada XvPer1-6a de *Pseudomonas putida* KT2440 respecto a su cepa parental. A partir del día 6 después del inicio de la desecación, las suspensiones bacterianas perdieron el agua completamente y la BSR de la cepa silvestre descendió casi el doble por

día. Con estos resultados podríamos suponer que la presencia del gen *XvPer1* le permite a la cepa modificada soportar más el estrés ocasionado por la pérdida de agua intracelular. Cuando la cepa modificada fue inoculada y sometida a condiciones de desecación desde la fase exponencial pareciera que el gen *XvPer1* no es expresado pues no existió diferencia cuando se comparó con la cepa silvestre en las mismas condiciones. Podemos sugerir que el gen *XvPer1* en la cepa modificada es expresado cuando alcanza la fase estacionaria. Muñoz-Rojas & Ramos (2009) probaron cepas modificadas de *Pseudomonas putida* KT2440 con el gen inserto de *XvPer1* en condiciones de desecación, sin embargo no abordaron el posible efecto de las ROS bajo estas condiciones. Para comprobar que el estrés oxidativo está implicado con la perdida de viabilidad celular bajo condiciones de desecación, se inocularon ambas cepas desde la fase estacionaria en condiciones desecantes (30^{o}C y 50% de humedad relativa) y realizamos mediciones de las especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares totales, se observó que la cepa silvestre durante todo el periodo de desecación acumuló mayor cantidad de ROS. Mientras que la cepa XvPer1-6a, mantuvo niveles menores de ROS durante los 18 días de monitoreo, estos resultados sustentan la idea de que el gen que codifica para 1-cys-peroxirredoxina influye en la remoción de ROS o en la menor producción de ROS intracelular. Con los resultados obtenidos al someter a desecación a ambas cepas de *Pseudomonas putida* KT2440 demostramos que el efecto que ejercen las ROS durante la desecación está relacionada directamente con la supervivencia bacteriana (Figura 9 y 12).

Sin embargo, la determinación de las ROS totales no nos permitió discriminar cual especie reactiva o cual actividad antioxidante de la célula fue la más importante baja estas condiciones. Así que se decidió analizar la actividad superoxido dismutasa de ambas cepas como un primer acercamiento, con lo que se pudo determinar una mayor actividad enzimática en la cepa modificada, estas proteínas antioxidantes son en muchos organismos la primera línea de defensa cuando comienzan a incrementar los niveles de superóxido en las células, por tanto su medición fue importante para conocer si había activación de estas enzimas cuando la célula comienza a perder agua al interior. En los cuatro puntos de medición (día 0, 6, 12 y 18) del experimento los niveles de actividad de las enzimas SODs

fue mayor en la cepa XvPer1-6a, la mayor actividad enzimática permitió a esta cepa controlar mejor la acumulación de ROS ya que desde un primer momento éstas células pudieron convertir una mayor cantidad del anión superóxido (O^-) a H_2O_2 el cual fue inmediatamente degradado a agua y oxígeno por la actividad de las peroxidasas (Figura 13).

Posteriormente realizamos el análisis de la expresión de diversos genes involucrados en la defensa contra el estrés oxidativo, evaluamos bajo estas condiciones en primera instancia el gen *XvPer1*, el cual Mowla *et al.,* (2002) mencionan que es un gen inducible por estrés, como es la salinidad, deshidratación, luminosidad y altas temperaturas. Este gen fue clonado en el genoma de *P.putida* KT2440, al ser una mutación al azar no conocemos en que parte del genoma se encuentra o que gen esta interrumpiendo, sin embargo Muñoz-Rojas & Ramos (2009) realizaron experimentos con diferentes mutantes de *P.putida* KT2440 con este y otros genes antioxidantes clonados. Estas cepas recombinantes mostraron mayor resistencia a condiciones ambientales adversas, como desecación y salinidad. El gen *XvPer1* insertado en *P.putida* KT2440 tiene un promotor fuerte $lacI^q$*/Ptrc* que es inducido por IPTG, no obstante nuestros experimentos fueron realizados sin inducción. Aúnque no se agregó el inductor IPTG, el gen aumentó su expresión en los días 6 y 12 del experimento (Figura 14), esto fue sorprendente y no tenemos una explicación para el aumento de la expresión. Mundree *et al.,* (2002) había reportado que *XvPer1* codifica para un antioxidante fuerte, una producción basal de esta peroxirredoxina puede explicar nuestros resultados ya que esta enzima ayuda a combatir las especies reactivas que se producen ante la pérdida de agua.

Se evaluó la expresión de genes considerados la principal línea de defensa, las superóxido dismutasas *sodA* (Mn-SOD) y *sodB* (Fe-SOD). La cepa silvestre bajo estas condiciones de desecación cambió la expresión del gen *sodB* y en menor medida la expresión de *sodA,* aumentándolas en ambos casos. (Figura 15 y 16). Este aumento de los transcritos se correlaciona con el aumento de la actividad SOD en el día 6, sin embargo no con el decremento de la actividad registrado en los días posteriores, 12 y 18. Una posible explicación a esta discrepancia en los resultados sería que el aumento de los transcritos de *SodB* sean una respuesta a la inactivación de esta proteína la cual es dependiente de hierro.

SodB es más suceptible al estrés oxidativo que SodA, la presencia de O_2^- desestabiliza el cluster de hierro, por lo cual el ión Fe^{2+} del centro catalítico de esta proteína puede ser oxidado a Fe^{3+} con más facilidad por acción del superóxido (O_2^-) (Gu & Imlay, 2013). Cuando realizamos las mediciones de estos genes en la cepa modificada, no se observó cambio en su expresión respecto al día 0, al parecer esta cepa no requiere producir mayor cantidad de transcritos para formar más proteínas SODs, pues ninguna de las dos enzimas (sodA y sodB) se ven afectadas significativamente por los oxidantes generados durante la desecación y la actividad se mantiene casi constante durante el periodo de experimentación. En cuanto a los genes que codifican para las catalasas, *KatA* y *KatB* estas mostraron una ligera disminución en su expresión en ambas cepas, en principio estas proteínas catalasas deberían remover el H_2O_2 intracelular, pero se observó que en la cepa silvestre estos genes parecieran reprimirse conforme aumentan los días de desecación. Este resultado sugiere que estas enzimas no son activadas y probablemente poco fundamentales para contender con la desecación. El siguiente paso fue analizar la expresión de otros genes que Kim & Park (2014) reportan como importantes en la respuesta al estrés oxidativo en dicho microorganismo. De esta manera, la expresión de *trxB* (tiorredixiona reductasa), *ahpC* (2-cys-peroxirredoxina), *zwf-1* (glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa), *fumC-1*(fumarato hidratasa) y *oprH* (porina, proteína de membrana) y *fpr* (ferredoxina reductasa-NADP) fue analizada (Figura 17 y 18).

La sobreexpresión de *ahpC*, la cual es una peroxirredoxina con actividad peroxidasa muy conservada en los phylos, en la cepa silvestre puede ser una enzima clave para la remoción de las ROS en la cepa silvestre, esta enzima utiliza los grupos tiol de las tiorredoxinas para activar y cortar peróxidos. El *"pool"* de tiorredoxinas (trx) en *Pseudomonas putida* KT2440 debe ser grande pues no se percibió cambio en la expresión de la *trxB*, la cual a través de NAPDH regenera las trx, no obstante esto también puede estar ligado con nula expresión de *zwf-1* principal generador de poder reductor, es decir, que la cepa silvestre bajo condiciones de desecación no puede generar suficiente poder reductor y esto puede relacionarse con el estado viable no cultivable, en el cual la célula podría sensar la situación adversa y activar una señalización para disminuir su metabolismo al máximo y evitar así el

daño por la acumulación de ROS. El aumento en la expresión de *fumC-1*, que codifica para la proteína fumarato hidratasa es independiente de hierro, y es activado toda vez que han sido oxidadas las fumarato hidratasas dependientes de Fe, las cuales son fumA y fumB, se pudo observar un aumento gradual en la expresión de *fumC-1* durante el periodo de desecación, esto puede indicar que la bacteria aunque no es cultivable esta metabólicamente activa para generar suficiente energía y mantener funciones a través del ciclo de Krebs. En tanto el gen *fpr* puede estar compensando la falta de producción de poder reductor en la vía de la pentosa fosfatos, pues su expresión aumentó 9.2 veces al día 6 de desecación, día en el que las muestras están deshidratadas completamente.

Por otro lado, en la cepa modificada con el gen *XvPer1* ninguno de estos 5 genes, excepto zwf-1 aumentó de manera importante su expresión en el día 12 después de la desecación, parece que para esta cepa no es necesario activar todo el mecanismo de antioxidantes nativos, pues *ahpC* no tuvo cambio alguno, lo mismo con el gen *trxB* que está relacionado con la activación de ahpC. Aunque no son muy claros los detalles de las vías de señalización redox en *P. putida* KT2440, Noctor & Foyer (2014) sugieren que los cambios involucrados en el estado redox de grupos tiol está relacionado. Las enzimas que se basan en este mecanismo tiol pueden tener tanto una función antioxidante como de señalización, en razón de un aumento de la acumulación intracelular de la molécula de H_20_2. Esto puede ser mediado ya sea por cambios en el potencial redox del glutatión o de las TRX, repercutiendo a proteínas blanco o causando cambios en la estructura de las mismas. A su vez Noctor & Foyer (2014) también sugieren que la desecación provoca modificaciones en el potencial redox de la célula oxidando cofactores como el glutatión total (GSH-GSSG), este cambio se relaciona con el estado tiol el cual participa en las vías de señalización ante el estrés oxidativo. *XvPer1* es dependiente de la proteína glutatión transferasa para su activación enzimática, aunque en este trabajo no se analizó algún gen del glutatión, podemos sugerir que el aumento de *zwf-1* está involucrado para la continua reducción del glutatión oxidado y que este glutatión reducido sirve para la activación de *XvPer1* (1-cys-peroxirredoxina), similar a lo que sucede con *ahpC.* También *fumC-1* no cambió su expresión en la cepa modificada, lo que nos sugiere que el ciclo de Krebs no fue afectado en esta cepa y por

consiguiente su metabolismo no tuvo que disminuir ni entrar en estado viable no cultivable como sucede en la cepa silvestre.

OprH es una proteína que ha sido estudiada en *Pseudomonas aeruginosa* en respuesta a antibióticos, sin embargo al ser OprH la unidad mayor dentro de las proteínas de membrana de este género fue de interés saber si el gen *oprH* pudiera estar ligado a los procesos de desecación. La expresión de *OprH* se analizó en ambas cepas de *Pseudomonas putida* KT2440, el gen aumentó más de 18 veces su expresión, no obstante la expresión ocurrió en diferentes días del monitoreo. El mayor cambio de expresión de este gen en la cepa silvestre se observó en el día 6 de desecación, justo cuando las células pierden el agua del medio, y cuando comienza un descenso marcado en la BSR de esta cepa. Mientras en la cepa modificada XvPer1-6a, la sobreexpresión de este gen se dio al día 12 después de la desecación, esto nos puede indicar que antes de los 12 días de desecación, esta cepa modifica no requiere hacer cambios en su membrana para evitar daño por la pérdida de agua intracelular.

Para cumplir con el último objetivo del trabajo hicimos mediciones del daño a membrana, de forma cualitativa con el LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability, al día 0 de desecación se pudo observar que existe un ligero daño a membrana en las dos cepas de interés, esto puede ser por varias razones: la limitación de nutrientes en la fase estacionaria activa varios estreses, los lavados con agua puede causar estrés, o el mismo proceso de respiración durante el secado puede formar las ROS. Para el día 18 después de la desecación el daño a membrana se incrementó en ambas cepas, las cuales fueron observadas a 100X en el microscopio de fluorescencia, en este día la cepa silvestre mostró mayor daño respecto a la cepa modificada, aunado a que no se pudo recuperar en placa, no se observaron células con emisión de luz verde, es decir, que no se observaron células viables de acuerdo al kit, pero si se observaron todas con emisión de luz roja lo que significa células no viables. La cepa modificada XvPer1-6a, al día 18 mostró una fluorescencia verde-naranja, evidenciando menor daño a la membrana. Es decir, que para esta cepa el daño a membrana indicado por el kit de fluorescencia, no es un factor determinante para su supervivencia debido a que a pesar de tener dañada su membrana las células siguen siendo cultivables. Para comprobar

cuantitativamente el daño en la membrana se utilizó el Lipid Hydorperoxide (LPO) Assay Kit con el cual pudimos medir la formación de hidroperóxidos en la membrana. Los resultados mostraron mayor formación de hidroperóxidos por cada UFC en la cepa modificada en comparación con la cepa silvestre al día cero, pero el aumento de la formación de hidroperóxidos al día 18 fue del 16% en la cepa silvestre y del 4% en la cepa modificada. Este menor daño de los lípidos de membrana en la cepa modificada podría ser la causa de su mayor tolerancia a desecación.

Con los resultados obtenidos, podemos sugerir que el mecanismo clave para la supervivencia de *Pseudomonas putida* KT2440 bajo condiciones de desecación es mediante la activación las defensas antioxidantes: superoxido dismutasas y peroxidasas. Una expresión basal, pero constitutiva de la 1-Cys peroxirredoxina mantuvo una alta actividad de las enzimas superoxido dismutasas, que en conjunto mantuvieron bajos niveles de ROS intracelular durante todo el experimento, afectando en menor medida la membrana celular y en resultado la cepa modificada pudo sobrevivir periodos más largos de desecación.

9. CONCLUSIONES

1. La cepa modificada con el gen *XvPer1* de Pseudomonas putida KT2440 es más tolerante a periodos de desecación respecto a la cepa silvestre.

2. La acumulación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en la cepa modificada son menores, se puede inferir que la actividad antioxidante de la peroxirredoxina que codifica el gen *XvPer1*, contribuye a la destoxificación de la célula.

3. La acumulación intracelular de las ROS condicionan la supervivencia bacteriana durante periodos de desecación.

4. La expresión basal sin inducción del gen XvPer1 es suficiente para que la cepa modificada pueda sobrevivir periodos más largos de desecación.

5. La cepa silvestre de *Pseudomonas putida* KT2440 durante la desecación experimenta un mayor estrés oxidativo que la cepa modificada XvPer1-6a, observándose mayores cambios de expresión genética de diversos genes involucrados con la defensa antioxidante.

6. La cepa modificada probablemente produce más poder reductor (NADPH) que le permite reducir el daño por las ROS regenerando proteínas antioxidantes dependientes como el glutation y las tiorredoxinas.

7. La cepa silvestre no activa la vía de la pentosa fosfatos durante la desecación y depende de la proteína fpr para disminuir el daño oxidativo.

8. Los periodos de desecación en el modelo *Pseudomonas putida* KT2440 inducen estrés oxidativo por el aumento y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

9. Aunque existe daño a membrana en ambas cepas, la menor aumento de la peroxidación lípidica en la cepa modificada XvPer1-6a, le permite sobrevivir por más días ante la pérdida de agua.

10. BIBLIOGRAFÍA

Abril, M., Michan, C., Timmis, K., & Ramos, J. (1989). Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *Journal of Bacteriology, 171*(12), 6782-6790.

Acharya, S., Foster, P. L., Brooks, P., & Fishel, R. (2003). The coordinated functions of the E. coli MutS and MutL proteins in mismatch repair. *Molecular cell, 12*(1), 233-246.

Alpert, P. (2005). The limits and frontiers of desiccation-tolerant life: Soc Integ Comp Biol.45:685–695

Alpert, P. (2006). Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or rare? *Journal of Experimental Biology, 209*(9), 1575-1584.

Anchordoguy, T. J., Carpenter, J. F., Cecchini, C. A., Crowe, J. H., & Crowe, L. M. (1990). Effects of protein perturbants on phospholipid bilayers. *Archives of biochemistry and biophysics, 283*(2), 356-361.

Antoun, H., & Prévost, D. (2005). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria *PGPR: Biocontrol and biofertilization* (pp. 1-38): Springer.

Armenta Bojórquez, A. D., García Gutiérrez, C., Camacho Báez, J. R., Apodaca Sánchez, M. A., & Gerardo Montoya, L., Nava-Pérez, E. (2010). BIOFERTILIZANTES EN EL DESARROLLO AGRÍCOLA DE MÉXICO ROLE OF BIOFERTILIZERS IN THE AGRICULTURAL DEVELOPMENT IN MEXICO. Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. Ra Ximhai 6: 51-56.

Baker, C. J., & Orlandi, E. W. (1995). Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual review of phytopathology, 33*(1), 299-321.

Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S., & Hernandez, 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.

Billi, D., & Potts, M. (2002). Life and death of dried prokaryotes. *Research in microbiology, 153*(1), 7-12.

Brierley, D. J., & Martin, S. A. (2013). Oxidative stress and the DNA mismatch repair pathway. *Antioxidants & redox signaling, 18*(18), 2420-2428.

Cárdenas-Rodríguez, N., Medina-Campos, O., & Pedraza-Chaverri, J. (2008). Glutatión peroxidasas: una familia de enzimas. *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Ed. Konigsberg M. México: El Manual Moderno*, 201-217.

Chavarría, M., Nikel, P. I., Pérez-Pantoja, D., & Lorenzo, V. (2013). The Entner–Doudoroff pathway empowers Pseudomonas putida KT2440 with a high tolerance to oxidative stress. *Environmental microbiology, 15*(6), 1772-1785.

Chen, S. x., & Schopfer, P. (1999). Hydroxyl-radical production in physiological reactions. *European Journal of Biochemistry, 260*(3), 726-735.

Corral-Lugo, A., Morales-García, Y. E., Pazos-Rojas, L. A., Ramírez-Valverde, A., Martínez-Contreras, R. D., & Muñoz-Rojas, J. (2012). Quantification of cultivable bacteria by the" Massive Stamping Drop Plate" method. *Revista Colombiana de Biotecnología, 14*(2), 147-156.

Crowe, L. M. (2002). Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 131*(3), 505-513.

Dietz, K.-J. (2011). Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. *Antioxidants & redox signaling, 15*(4), 1129-1159.

Ding, N., Bonham, E. M., Hannon, B. E., Amick, T. R., Baylin, S. B., & O'Hagan, H. M. (2015). Mismatch repair proteins recruit DNA methyltransferase 1 to sites of oxidative DNA damage. *Journal of molecular cell biology*, mjv050.

Dixon, D. P., Hawkins, T., Hussey, P. J., & Edwards, R. (2009). Enzyme activities and subcellular localization of members of the Arabidopsis glutathione transferase superfamily. *Journal of Experimental Botany, 60*(4), 1207-1218.

Dos Santos, V., Heim, S., Moore, E., Strätz, M., & Timmis, K. (2004). Insights into the genomic basis of niche specificity of Pseudomonas putida KT2440. *Environmental microbiology, 6*(12), 1264-1286.

Elez, M., Radman, M., & Matic, I. (2012). Stoichiometry of MutS and MutL at unrepaired mismatches in vivo suggests a mechanism of repair. *Nucleic acids research*, gkr1298.

Espinosa-Urgel, M., Kolter, R., & Ramos, J.-L. (2002). Root colonization by Pseudomonas putida: love at first sight. *Microbiology, 148*(2), 341-343.

Federal register.(1982). Certified host-vector systems, p. 17197

Fernández-Sandoval, M., Ortiz-García, M., Galindo, E., & Serrano-Carreón, L. (2012). Cellular damage during drying and storage of Trichoderma harzianum spores. *Process Biochemistry, 47*(2), 186-194.

Follonier, S., Escapa, I. F., Fonseca, P. M., Henes, B., Panke, S., Zinn, M., & Prieto, M. A. (2013). New insights on the reorganization of gene transcription in Pseudomonas putida KT2440 at elevated pressure. *Microbial cell factories, 12*(1), 30.

Foyer, C. H., Lopez-Delgado, H., Dat, J. F., & Scott, I. M. (1997). Hydrogen peroxide-and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum, 100*(2), 241-254.

Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual review of biochemistry, 64*(1), 97-112.

Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. *Journal of Experimental Biology, 201*(8), 1203-1209.

Garza-López P M. (2008). Cambios fisiológicos de Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. Como respuesta a la composición atmosférica (Tesis de Maestría) . UAM, Iztapalapa.

Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry, 48*(12), 909-930.

Gu, M., & Imlay, J. A. (2013). Superoxide poisons mononuclear iron enzymes by causing mismetallation. *Molecular microbiology, 89*(1), 123-134.

Gray, M. J., & Jakob, U. (2015). Oxidative stress protection by polyphosphate—new roles for an old player. *Current opinion in microbiology, 24*, 1-6.

Hansberg-Torres W. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mens Bioquim*, *26*, 19-53.

Hansen, J. M., Zhang, H., & Jones, D. P. (2006). Mitochondrial thioredoxin-2 has a key role in determining tumor necrosis factor-α–induced reactive oxygen species generation, NF-κB activation, and apoptosis. *Toxicological Sciences, 91*(2), 643-650.

Hernández-Canseco J. (2015). Supervivencia a la desecación de bacterias que cointeraccionan antes del estrés (Tesis de Maestría). CICM-ICUAP, Puebla.

Herrmann, L., & Lesueur, D. (2013). Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Applied microbiology and biotechnology, 97*(20), 8859-8873.

Imlay, J. A. (2013). The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nature Reviews Microbiology, 11*(7), 443-454.

Imlay, J. A. (2015). Diagnosing oxidative stress in bacteria: not as easy as you might think. *Current opinion in microbiology, 24*, 124-131.

Iqbal, A., Yabuta, Y., Takeda, T., Nakano, Y., & Shigeoka, S. (2006). Hydroperoxide reduction by thioredoxin-specific glutathione peroxidase isoenzymes of Arabidopsis thaliana. *The FEBS journal, 273*(24), 5589-5597.

Jhamaria, C., & Yadav, R. K. (2013). Environmental Biotechnology: Achievements, Perception and Prospects: A Review.

Jiménez, J. I., Miñambres, B., García, J. L., & Díaz, E. (2002). Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental microbiology, 4*(12), 824-841.

Kaihami, G. H., de Almeida, J. R. F., dos Santos, S. S., Netto, L. E. S., de Almeida, S. R., & Baldini, R. L. (2014). Involvement of a 1-Cys peroxiredoxin in bacterial virulence. *PLoS Pathog, 10*(10), e1004442.

Khalid, A., Arshad, M., & Zahir, Z. (2004). Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology, 96*(3), 473-480.

Kranner, I., & Birtić, S. (2005). A Modulating Role for Antioxidants in Desiccation Tolerance1. *Integrative and Comparative Biology, 45*(5), 734-740.

Kim, E. J., Chung, H. J., Suh, B., Hah, Y. C., & Roe, J. H. (1998). Transcriptional and post-transcriptional regulation by nickel of sodN gene encoding nickel-containing superoxide dismutase from Streptomyces coelicolor Müller. *Molecular microbiology, 27*(1), 187-195.

Kim, Y. C., Miller, C. D., & Anderson, A. J. (1999). Transcriptional regulation by iron of genes encoding iron-and manganese-superoxide dismutases from *Pseudomonas putida*. *Gene, 239*(1), 129-135.

Kim, J., & Park, W. (2014). Oxidative stress response in *Pseudomonas putida*. *Applied microbiology and biotechnology, 98*(16), 6933-6946.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. *methods, 25*(4), 402-408.

Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions, 224*, 164-175.

Manevich, Y., Feinstein, S., & Fisher, A. (2004). Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with πGST. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101*(11), 3780-3785.

Miller, G., Suzuki, N., CIFTCI-YILMAZ, S., & Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, cell & environment, 33*(4), 453-467.

Molina, M. D., & Anchordoquy, T. J. (2008). Formulation strategies to minimize oxidative damage in lyophilized lipid/DNA complexes during storage. *Journal of pharmaceutical sciences, 97*(12), 5089-5105.

Morales-García Y. E., Juárez-Hernández D., Muñoz-García A. Hernández Tenorio A.L., y Muñoz-Rojas J. (2011). Efecto de un multinoculante con especies compatibles sobre maíz. (Zea Mays). Memoria VIII encuentro "Participación de la mujer en la ciencia". In extenso. Biotecnología y Ciencias Agropecuarias. ISBN: 978-607-95228-2-7. León, Guanajuato, México.

Monteiro, G., Horta, B. B., Pimenta, D. C., Augusto, O., & Netto, L. E. (2007). Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 104*(12), 4886-4891.

Morgan, C. A., Herman, N., White, P., & Vesey, G. (2006). Preservation of micro-organisms by drying; a review. *Journal of microbiological methods, 66*(2), 183-193.

Mowla, S. B., Thomson, J. A., Farrant, J. M., & Mundree, S. G. (2002). A novel stress-inducible antioxidant enzyme identified from the resurrection plant Xerophyta viscosa Baker. *Planta, 215*(5), 716-726.

Mundree, S. G., Whittaker, A., Thomson, J. A., & Farrant, J. M. (2000). An aldose reductase homolog from the resurrection plant Xerophyta viscosa Baker. *Planta, 211*(5), 693-700.

Mundree, S. G., Baker, B., Mowla, S., Peters, S., Marais, S., Vander Willigen, C., . Farrant, J. M. (2002). Physiological and molecular insights into drought tolerance. *African Journal of Biotechnology, 1*(2), 28-38.

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 natural. Articulo *in extenso.* En Memorias del V encuentro Nacional de Biotecnología-IPN. Área temática 3, Pp. 50-54. En: Durán-Páramo y Salgado-Monrajerrez (eds.). Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.

Muñoz-Arenas L. C., Pazos- Rojas L. A., Morales-García Y. E., Toribio-Rosales C., Bustillos-Cristales M. R. and Muñoz-Rojas J. (2008). Evaluación de exudados de maíz (Raíz) para proteger a *P.putida* KT2440 de la desecación. En Memorias del VII Congreso Internacional, XII Congreso Nacional y III Congreso Regional de Ciencias Ambientales. Área temática Tecnología y Biotecnología Ambiental.

Muñoz-Celaya, A. L., Ortiz-García, M., Vernon-Carter, E. J., Jauregui-Rincón, J., Galindo, E., & Serrano-Carreón, L. (2012). Spray-drying microencapsulation of *Trichoderma harzianum* conidias in carbohydrate polymers matrices. *Carbohydrate polymers, 88*(4), 1141-1148.

Muñoz-Rojas, J., Bernal, P., Duque, E., Godoy, P., Segura, A., & Ramos, J.-L. (2006). Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. *Applied and Environmental Microbiology, 72*(1), 472-477.

Muñoz-Rojas J., **Ramos Martin J. L.* (Inventores)** 2009. Microorganismos recombinantes que contienen un gen de resistencia a estrés salino y sus aplicaciones. Solicitud de patente No. P200602012.9. No. Referencia P1921ES00. No. Publicación ES2307391A1 (16 de noviembre de 2008). España. Fecha de publicación de la concesión: 28 de septiembre de 2009.

Nelson, K. J., Knutson, S. T., Soito, L., Klomsiri, C., Poole, L. B., & Fetrow, J. S. (2011). Analysis of the peroxiredoxin family: Using active-site structure and sequence information for global classification and residue analysis. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 79*(3), 947-964.

Nelson, K., Weinel, C., Paulsen, I., Dodson, R., Hilbert, H., Martins dos Santos, V., . . . Holmes, M. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental microbiology, 4*(12), 799-808.

Nikel, P. I., Kim, J., & Lorenzo, V. (2014). Metabolic and regulatory rearrangements underlying glycerol metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental microbiology, 16*(1), 239-254.

Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols, 1*(3), 1559-1582.

Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of plant biology, 49*(1), 249-279.

Noctor, G., Mhamdi, A., & Foyer, C. H. (2014). The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. *Plant Physiology, 164*(4), 1636-1648.

Pazos-Rojas. L. A. (2008). Estudios sobre la desecación de *Pseudomonas putida* KT2440 (Tesis pregrado). CICM-ICUAP, Puebla.

Park, W., Peña-Llopis, S., Lee, Y., & Demple, B. (2006). Regulation of superoxide stress in Pseudomonas putida KT2440 is different from the SoxR paradigm in Escherichia coli. *Biochemical and biophysical research communications, 341*(1), 51-56.

Perkins, A., Nelson, K. J., Parsonage, D., Poole, L. B., & Karplus, P. A. (2015). Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends in biochemical sciences, 40*(8), 435-445.

Potts, M. (1994). Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiological reviews, 58*(4), 755-805.

Prestrelski, S. J., Tedeschi, N., Arakawa, T., & Carpenter, J. F. (1993). Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophysical journal, 65*(2), 661-671.

Ramos, J. L., Díaz, E., Dowling, D., de Lorenzo, V., Molin, S., O'Gara, F., Timmis, K. N. (1994). The behavior of bacteria designed for biodegradation. *Nature Biotechnology, 12*(12), 1349-1356.

Ramos, J. L., Gallegos, M. a.-T., Marqués, S., Ramos-González, M.-I., Espinosa-Urgel, M., & Segura, A. (2001). Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. *Current opinion in microbiology, 4*(2), 166-171.

Rebah, F. B., Prévost, D., Yezza, A., & Tyagi, R. (2007). Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: a review. *Bioresource technology, 98*(18), 3535-3546.

Rueda-Puente, E., Farmohammadi, S., Moghaddam, A., & Zakeri, O. (2011). Plant growth promoting bacteria associated to Salicornia rhyzosphere in Abbas, Iran. *Agric Sci Res J, 1*(7), 155-165.

Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology, 24*(10), R453-R462.

Schoebitz, M., López, M. D., & Roldán, A. (2013). Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil–plant fertilization. A review. *Agronomy for sustainable development, 33*(4), 751-765.

Sherwin, H. W., & Farrant, J. M. (1998). Protection mechanisms against excess light in the resurrection plants Craterostigma wilmsii and *Xerophyta viscosa*. *Plant Growth Regulation, 24*(3), 203-210.

Souza, R. d., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and molecular biology, 38*(4), 401-419.

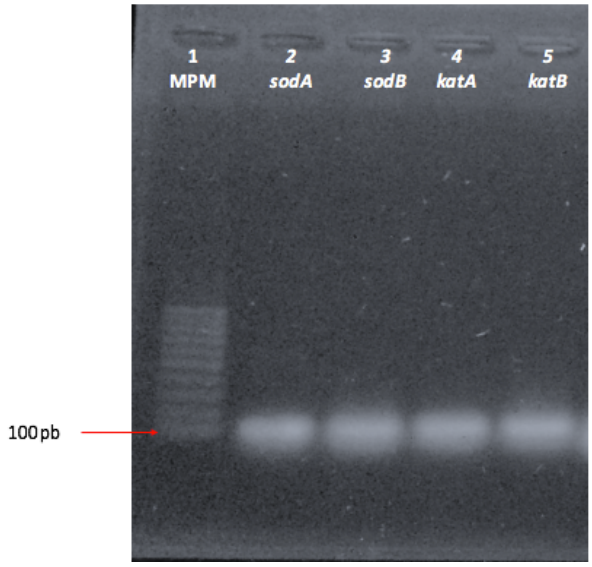
Torres-Barceló, C., Cabot, G., Oliver, A., Buckling, A., & MacLean, R. C. (2013). *A trade-off between oxidative stress resistance and DNA repair plays a role in the evolution of elevated mutation rates in bacteria.* Paper presented at the Proc. R. Soc. B.

Ulhívorá E. D. Elhottová, J. Triska & H. Santrucková. **(2005).** Physiology and Microbial Community Structure in Soil at Extreme Water Content. Folia Microbiol. 50(2):161-166.

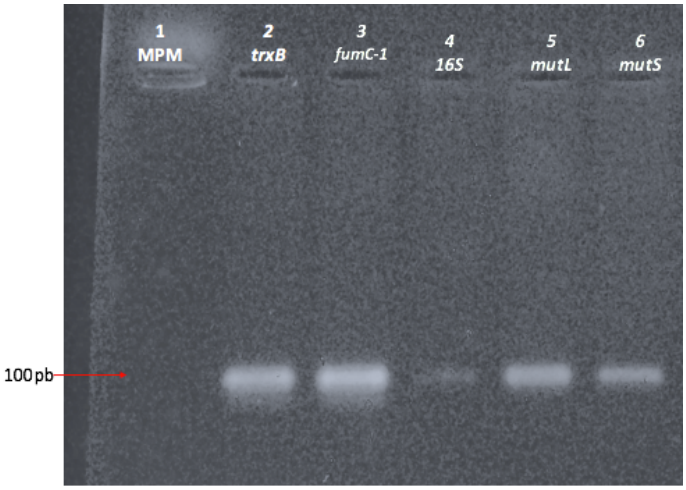
Vriezen, J. A., De Bruijn, F. J., & Nüsslein, K. (2007). Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen, and temperature. *Applied and environmental microbiology*, *73*(11), 3451-3459.

Zuo, Z., Gong, T., Che, Y., Liu, R., Xu, P., Jiang, H., & Yang, C. (2015). Engineering *Pseudomonas putida* KT2440 for simultaneous degradation of organophosphates and pyrethroids and its application in bioremediation of soil. *Biodegradation*, *26*(3), 223-233.

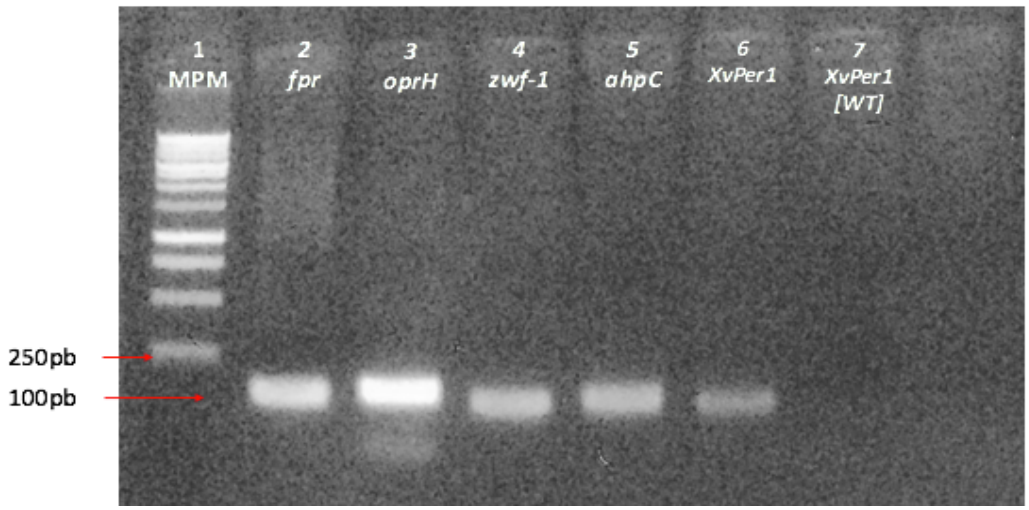
ANEXO



Anexo 1. RT- PCR de punto final de genes de P.putida KT2440. Línea 1: Marcador de peso molecular 100pb Jena Biosciences. Línea 2-5: genes.



Anexo 2. RT- PCR de punto final de genes de P.putida KT2440. Línea 1: Marcador de peso molecular 100pb Jena Biosciences. Línea 2-6: genes.



Anexo 3. RT- PCR de punto final de genes de P.putida KT2440. Línea 1: Marcador de peso molecular 250pb Jena Biosciences. Línea 2-7: genes.