



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



**INSTITUTO DE CIENCIAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS
MICROBIOLÓGICAS**

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

**“SUPERVIVENCIA A LA DESECACIÓN DE BACTERIAS QUE
COINTERACCIONAN ANTES DEL ESTRÉS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCIÓN EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA**

PRESENTA:

BIOL. MAR. JESSIE HERNÁNDEZ CANSECO

ASESOR DE TESIS:

D. C. JESÚS MUÑOZ ROJAS



BUAP

Puebla, Pue. a 9 de abril de 2015.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la C. Jessie Hernández Canseco, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

"Supervivencia a la desecación de bacterias que cointeraccionan antes del estrés"

A nuestro juicio, la C. Hernández Canseco puede proceder a la impresión de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente,
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"


D.C. Miguel Castañeda Lucio


D.C. Patricia Lozano Zarain


D.C. Alma Rosa Nezahuatl Muñoz


D.C. Yolanda Elizabeth Morales García

Este trabajo fue realizado con el apoyo de CONACYT 156576, DITCo2014-09, DITCo2015-29, VIEP NAT14-I y VIEP NAT15-I en el Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas-ICBUAP.

Agradecimientos especiales al CONACYT por haber otorgado la beca de estudios durante el posgrado y a la VIEP por el apoyo con una beca terminal de tesis.

A la dulce Petrova y al tan esperado Leonardo

Agradecimientos

Agradezco enormemente a todas las personas que hicieron posible la realización de este trabajo de investigación. Sin sus conocimientos, tiempo, paciencia y amistad, no se hubiera concluido satisfactoriamente. Con profundo afecto agradezco a mi director de tesis, el D.C. Jesús Muñoz Rojas, por la atención brindada en todo momento para despejar mis dudas, corregir mis errores y mejorar mis aciertos.

Agradezco también a mi comité revisor por sus enseñanzas y apoyo durante este tiempo, a la D.C. Alma Rosa Nezahuatl Muñoz, a la D.C. Patricia Lozano Zaraín, a la D.C. Yolanda Elizabeth Morales García y al D.C. Miguel Castañeda Lucio por compartir sus conocimientos durante mi formación y por las acertadas observaciones durante la elaboración de la tesis.

Por otro lado, expreso mi agradecimiento a la M.C. Rocío Bustillos Cristales, por la guía y el apoyo técnico en el laboratorio.

Al M. C. Osvaldo Rodríguez Andrade y a la M. C. Dalia Molina Romero por el apoyo técnico en el laboratorio y sus invaluable observaciones al trabajo.

Al M. C. Yagul Pedraza Pérez por la valiosa asesoría durante el análisis bioinformático.

A Verónica Aguilar Franco, por su gran habilidad y eficiencia para la recuperación de artículos científicos sin los cuales no se habría podido realizar este trabajo.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana: Osvaldo, Dalia Molina, Dalia Juárez, Ana Laura, Fernando, Rojan, Ivonne, Cathy, Yair y Mónica quienes durante este largo proceso me apoyaron incondicionalmente, por supuesto también a Simón, Rafael, Bruce, Angélica y Victor Manuel, quienes pese a estar un corto tiempo en el laboratorio también me apoyaron.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por abrirme las puertas y facilitar la realización de esta investigación.

A la VIEP por haber otorgado una beca terminal de tesis sin la cual no se habría podido culminar este proyecto.

Y finalmente, al CONACyT por el invaluable apoyo económico durante la maestría.

Índice

	Página
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Índice	vi
Índice de figuras	viii
Índice de tablas	ix
Resumen	x
I. Introducción	1
Bacterias benéficas	1
Estrés por desecación	3
Daños por desecación	4
Mecanismos de resistencia a la desecación	5
Acuaporinas	6
Proteínas LEA	7
Solutos compatibles	7
Producción de exopolisacáridos	9
Osmoprotectores	10
Antioxidantes y destoxificantes	10
Sistemas de reparación del ADN	11
Modificación de membrana	12
Estado viable no cultivable	13
Aplicaciones biotecnológicas de la resistencia a la desecación	14
II. Antecedentes	16
<i>Klebsiella variicola</i> T29A2	16
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	17
III. Justificación	19
IV. Hipótesis	21
V. Objetivos	21
VI. Método	22
Diseño de medios selectivos	22
Antagonismo bacteriano	23
Experimentos de cointeracción y desecación	24
Cointeracción durante del estrés	24
Cointeracción antes el estrés	24
Cointeracción con mutantes de <i>K. variicola</i> T29A2	25
Tasa de Supervivencia Bacteriana	27
Comprobación de la inserción del transposón miniTn5	28
PCRs arbitrarias	28
Secuenciación e identificación de la función de genes	30
Identificación de genes	31
Análisis de genomas	31

VII. Resultados.....	32
Experimentos de cointeracción y desecación	32
Cointeracción durante del estrés.....	32
Cointeracción antes del estrés	33
Cointeracción con mutantes de <i>K. variicola</i> T29A2	34
Comprobación de la inserción del transposón mini-Tn5 en mutantes	38
PCRs arbitrarias	39
Secuenciación e identificación de la función de genes	40
Identificación de genes.....	45
Análisis de genomas	48
VIII. Discusión.....	51
IX. Conclusiones.....	64
X. Perspectivas.....	66
XI. Referencias	67
ANEXOS.....	77

Índice de figuras

Figura	Página
1. Pruebas de inhibición simultánea entre <i>K. variicola</i> T29A2 y <i>P. putida</i> KT2440. A) <i>K. variicola</i> T29A2. B) <i>P. putida</i> KT2440.	23
2. Diseño experimental para evaluar dos tipos de cointeracción entre <i>K. variicola</i> T29A2 y <i>P. putida</i> KT2440. A) Cointeracción durante el estrés. B) Cointeracción antes del estrés.	25
3. Método rápido para evaluar la supervivencia a la desecación de mutantes de <i>K. variicola</i> T29A2 en cointeracción con <i>P. putida</i> KT2440. A) Diseño experimental. B) Distribución de las muestras.	26
4. Supervivencia a la desecación de <i>P. putida</i> KT2440 y <i>K. variicola</i> T29A2 sometidas al estrés sin interactuar. Cada punto del gráfico representa el promedio de 5 réplicas con su respectiva desviación estándar	32
5. Supervivencia a la desecación de <i>P. putida</i> KT2440 y <i>K. variicola</i> T29A2 cuando cointeraccionan durante el estrés. Análisis de cinco réplicas por cada tiempo y su respectiva desviación estándar	33
6. Supervivencia a la desecación de <i>P. putida</i> KT2440 y <i>K. variicola</i> T29A2 cuando cointeraccionan 24 horas antes de someterse al estrés. Análisis de cinco réplicas y su respectiva desviación estándar	34
7. Identificación de mutantes que pierden la habilidad de proteger a <i>P. putida</i> KT2440 de la desecación mediante el método rápido. Antes de la desecación (arriba). Después de 5 días de desecación (abajo). Las mutantes se identifican con números, mientras que, los controles se refieren a <i>P. putida</i> KT2440 en cointeracción con la cepa silvestre de <i>K. variicola</i> T29A2, así como <i>P. putida</i> y <i>K. variicola</i> silvestre sin interactuar	35
8. Supervivencia a la desecación de <i>P. putida</i> KT2440 en cointeracción con la mutante 16. Análisis de cinco réplicas y su respectiva desviación estándar.	36
9. Supervivencia a la desecación de <i>P. putida</i> KT2440 en cointeracción con la mutante 6. Análisis de cinco réplicas y su respectiva desviación estándar.	37
10. Supervivencia a la desecación de <i>P. putida</i> KT2440 en cointeracción con la mutante 85. Análisis de cinco réplicas y su respectiva desviación estándar.	37
11. Supervivencia a la desecación de <i>P. putida</i> KT2440 en cointeracción con la mutante 51. Análisis de cinco réplicas y su respectiva desviación estándar.	38
12. Productos de amplificación del gen de resistencia a kanamicina. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Carril 1: Marcador molecular. Carril 2: <i>E. coli</i> cc118 (control positivo). Carril 3: <i>K. variicola</i> T29A2 silvestre (control negativo). Carril 4: <i>mutante 16</i> . Carril 5: <i>mutante 6</i> . Carril 6: <i>mutante 85</i> . Carril 7: <i>mutante 51</i> . Carril 8: <i>mutante tomada al azar de la banca</i>	39
13. Productos de amplificación mediante PCRs arbitrarias. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Carril 1: Marcador molecular. Carril 2: <i>K. variicola</i> T29A2 silvestre (control negativo). Carril 3: <i>mutante 6</i> . Carril 4: <i>mutante 16</i> . Carril 5: <i>mutante 85</i> . Carril 6: <i>mutante 51</i>	40

14. A) Secuencia obtenida de la banda amplificada a partir del ADN de la mutante 6. *Secuencia correspondiente a la región "O" del mini-Tn5. B) Resultados del análisis de alineamiento de acuerdo al porcentaje de identidad. C) Análisis de dominios conservados en la secuencia.....	42
15. A) Secuencia obtenida de la banda amplificada a partir del ADN de la mutante 85. *Secuencia correspondiente a la región "O" del mini-Tn5. B) Resultados del análisis de alineamiento de acuerdo al porcentaje de identidad. C) Ubicación de la proteína KPN_pKPN4p07135 en el plásmido pKPN4.	43
16. A) Secuencia obtenida de la banda amplificada a partir del ADN de la mutante 51. *Secuencia correspondiente a la región "O" del mini-Tn5. B) Resultados del análisis de alineamiento de acuerdo al porcentaje de identidad. C) Análisis de dominios conservados en la secuencia.....	44
17. A) Diseño de oligonucleótidos con base en la secuencia del gen <i>sat</i> . Secuencias de los oligos SAT_KvarA al inicio y SAT_KvarB al final del gen (en rojo). Secuencia obtenida mediante PCRs arbitrarias (en negro).....	45
18. Productos de amplificación del gen <i>sat</i> . Electroforesis en gel de agarosa 1%. Carril 1: Marcador molecular. Carril 2: <i>mutante 51</i> . Carril 3: <i>mutante aleatoria</i> . Carril 4: <i>mutante 6</i> . Carril 5: <i>K. variicola</i> T29A2 silvestre. Carril 6: <i>P. putida</i> KT2440 (control negativo).	46
19. Producto de amplificación del gen <i>sat</i> en la mutante de interés. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Carril 1: Marcador molecular. Carril 2 – 4: Amplificación con oligos TNINT y SAT_KvarA. Carril 5 – 7: Amplificación con oligos TNINT y SAT_KvarB. Carril 2: <i>mutante 51</i> . Carril 3: <i>K. variicola</i> T29A2 silvestre. Carril 4: <i>mutante aleatoria</i> . Carril 5: <i>mutante 51</i> . Carril 6: <i>K. variicola</i> T29A2 silvestre. Carril 7: <i>mutante aleatoria</i>	47
20. Resultados confirmatorios de la secuencia amplificada con los oligos TNINT y SAT_KvarB en la mutante 51	47

Índice de tablas

Tabla	Página
I. Medios de selección utilizados en este estudio.	22
II. Transportadores de glutatión encontrados en especies del género <i>Klebsiella</i> . T=Transportador, E=E-value, BS=Bit Score.....	49
III. Transportadores de glutatión encontrados en especies del género <i>Pseudomonas</i> . T=Transportador, E=E-value, BS=Bit Score.	50

Resumen

P. putida KT2440 es una bacteria capaz de mineralizar compuestos orgánicos complejos así como de promover el crecimiento del maíz criollo. Gracias a la excelente colonización de esta bacteria en las raíces de diversas plantas, se propone como una buena alternativa para la rizorremediación de compuestos xenobióticos y la promoción del crecimiento en plantas, no obstante, algunos estudios han mostrado que esta cepa es altamente sensible a la desecación.

El objetivo del presente estudio fue explorar la habilidad de una bacteria tolerante a la desecación (*Klebsiella variicola* T29A2) para proteger a una bacteria sensible (*P. putida* KT2440), además de explorar el posible mecanismo por el cual ocurre dicha protección. Se evaluó la supervivencia a la desecación de *K. variicola* y *P. putida* cuando cointeraccionan antes y durante el estrés. De acuerdo con los resultados, la cointeracción de *K. variicola* con *P. putida* KT2440 antes del estrés ayuda a mejorar la supervivencia de *P. putida* significativamente respecto a su supervivencia cuando se somete al estrés por sí sola.

Por otro lado, se evaluó la supervivencia a la desecación de 600 mutantes de *K. variicola* (miniTn5-km) en cointeracción con *P. putida* KT2440. Se encontraron tres mutantes que dejaron de proteger a *P. putida* de la desecación. Los genes de estas mutantes se identificaron mediante la metodología de PCRs arbitrarias y secuenciación. La comparación de las secuencias en la base de datos pública NCBI mostró que corresponden a genes que codifican para proteínas hipotéticas de *K. pneumoniae* involucradas en la regulación transcripcional de elementos de respuesta a xenobióticos que involucran ROS y una serina-O-acetiltransferasa involucrada en la síntesis de cisteína en la célula.

Algunos antioxidantes como el glutatión, tienen un residuo de cisteína como núcleo activo donde reaccionan con especies reactivas de oxígeno (ROS) en el interior celular. El glutatión es exportado activamente para regular sus concentraciones tóxicas dentro de la célula. El análisis de los genomas de ambas bacterias mostró que *K. variicola* tiene tanto sistemas de exportación como de importación de glutatión, mientras que *P. putida* solo tiene sistemas de importación para pequeños péptidos cuya función para el transporte de glutatión aún no ha sido reportada.

Este estudio mostró que la interacción antes del estrés entre bacterias resistentes a la desecación y bacterias sensibles, mejora la supervivencia de las bacterias sensibles. Por

otro lado se propone que el mecanismo por el cual *P. putida* KT2440 se protege del daño por desecación, podría implicar la incorporación de solutos que son sintetizados y exportados por *K. variicola* durante el crecimiento en cointeracción con *P. putida* para contender contra el estrés oxidativo que implica la desecación extrema.

I. Introducción

I.1 Bacterias Benéficas

De la gran diversidad de microorganismos que participan en los procesos químicos y biológicos que sustentan la vida en la tierra, las bacterias han sido ampliamente estudiadas ya que una gran parte de estas poseen propiedades benéficas. Las bacterias benéficas presentan diversas actividades metabólicas que les permiten llevar a cabo su función benéfica en una amplia variedad de campos como la biorremediación, biomedicina, agricultura, ecología y biotecnología (Bloemberg & Lugtenberg, 2001; Broadbent *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2005).

Una de las propiedades benéficas más estudiadas en las bacterias es la promoción del crecimiento en plantas. Las rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR por sus siglas en inglés), ejercen su efecto mediante diversos mecanismos que incluyen la fijación biológica de nitrógeno (FNB), el aumento de la disponibilidad de nutrientes en la rizósfera, la influencia positiva en la morfología y tamaño de las raíces de la planta, el control biológico y la potenciación de otras simbiosis benéficas planta-microorganismo (Lugtenberg & Kamilova, 2009).

Las bacterias PGPR tienen un gran potencial en la agricultura ya que pueden incrementar la producción de los cultivos y aumentar la protección de las plantas contra distintas presiones ambientales que incluyen heladas, salinidad, sequía y estrés por la presencia de contaminantes xenobióticos (Vilchez & Manzanera, 2011). Hoy en día la aplicación directa de las propiedades benéficas de este tipo de bacterias se realiza a través de inoculantes (biofertilizantes) con la finalidad de reducir el uso de fertilizantes químicos y plaguicidas que contaminan el ambiente (Bashan, 1998; Bloemberg & Lugtenberg, 2001).

Un inoculante se define como una formulación que contiene una o más especies bacterianas benéficas en un material acarreador económico y fácil de usar, la función principal del acarreador es la de transportar de forma viable a las bacterias de interés, desde la industria hasta los campos de cultivo, donde se llevarán a cabo los efectos benéficos de cada bacteria, por ejemplo, la promoción del crecimiento de las plantas inoculadas (Bashan, 1998).

La elección de las cepas que integren un inoculante debe realizarse con base a distintos criterios que determinan su éxito en el campo:

1) En primer lugar, las cepas que integren el inoculante deben ser competitivas en el ambiente donde será aplicado, ya que su supervivencia depende de la adaptabilidad de estas al nuevo ambiente, para ello, algunas bacterias han desarrollado diversas estrategias como la mejora en sus sistemas de quimiotaxis (De Weert *et al.*, 2002; Muñoz-Aguilar *et al.*, 1988) o elaborando compuestos antimicrobianos que inhiben el crecimiento de otros microorganismos en el suelo (Riley & Wertz, 2002).

2) Aunado a lo anterior, las bacterias usadas en el inoculante deben ser buenas promotoras del crecimiento en plantas, lo cual se conoce gracias a estudios previos de colonización, adherencia a raíces y los mecanismos con los que promueven el crecimiento tales como la fitoestimulación, producción de sustancias de biocontrol, fijación biológica de nitrógeno o inducción de la resistencia sistémica de la planta (Bloembergen & Lugtenberg, 2001).

3) Por otro lado, las bacterias inoculadas deben ser capaces de colonizar la planta sin causar daño.

4) Finalmente, para un mejor efecto en la supervivencia de la bacteria y su habilidad promotora del crecimiento en las plantas, las bacterias deberán soportar periodos largos de desecación para interaccionar con las plantas en momentos oportunos de hidratación (Muñoz-Arenas, 2011).

Algunos estudios se han centrado en encontrar formas de hacer tolerantes a la desecación a diversas plantas de interés agrícola mediante la manipulación genética, ingresando genes a las plantas cuyos productos enfrentan directa o indirectamente el estrés ambiental, como osmoprotectores, agentes contra especies reactivas de oxígeno y proteínas inducidas por el estrés (Cushman & Bohnert, 2000; Swamy & Kumar, 2013; Li *et al.*, 2012). Recientemente se observó que bacterias recombinantes que expresan genes de resurrección, son más tolerantes a desecación y salinidad, pero además son capaces de incrementar la tolerancia a las plantas con las que cointeraccionan bajo condiciones adversas de salinidad (Muñoz-Rojas & Ramos, 2009).

No obstante, debido a la polémica actual sobre el uso de organismos modificados y la contaminación de los mantos freáticos por nitrógeno derivado de las prácticas agrícolas, el uso de bacterias PGPR, es considerado una buena práctica biotecnológica ya que favorece el desarrollo de los cultivos, beneficia al productor disminuyendo costos destinados a fertilizantes químicos y pesticidas, y se ha descrito como ambientalmente segura y

económica (Castellanos *et al.*, 2000; Aguirre-Medina, 2006; Hernández-Flores *et al.*, 2011; Turrent-Fernández, 2008).

I.2 Estrés por desecación

Uno de los mayores problemas que enfrenta la agricultura, principalmente en regiones áridas y semiáridas, es la escasez de agua de riego y la degradación del suelo debido a la desecación y salinidad (Rueda-Puente *et al.*, 2011; Vriezen *et al.*, 2007). El estrés por desecación así como por cualquier parámetro ambiental adverso limita el crecimiento de las plantas y la productividad (Boyer, 1982).

Debido a lo anterior, se han realizado diversos estudios de las respuestas a este estrés en plantas (Claeys *et al.*, 2014; Leprince & Buitink, 2010), y dado que la inoculación de microorganismos benéficos se ha contemplado como una buena alternativa en la mejora del crecimiento y rendimiento de las plantas, también se han hecho estudios en busca de microorganismos tolerantes a las condiciones de desecación y salinidad características de las zonas áridas. Estos microorganismos sobreviven a periodos largos de sequía y ejercen un mejor efecto benéfico en la planta cuando ocurre la rehidratación (Escribano-Antemate, *et al.*, 2007, Hernández-Flores, *et al.*, 2011; Groppa *et al.*, 2012).

La propiedad de cualquiera de los microorganismos inoculados en el campo, puede ser afectada por diversos factores bióticos y abióticos (Bloemberg & Lugtenberg, 2001), como la variación en la temperatura, la disponibilidad de nutrientes, así como la presencia de moléculas tóxicas que interrumpen las condiciones óptimas de vida (Ramos *et al.*, 2001), no obstante, el contenido de agua en el suelo es uno de los factores más limitantes de la actividad microbiana y tiene un efecto importante en la viabilidad de las células (Uhlívorá *et al.*, 2005).

La desecación, es un fenómeno que consiste en la pérdida de agua intracelular hasta alcanzar el equilibrio con el agua presente en el ambiente; una definición cuantitativa de la desecación extrema es la pérdida de agua hasta alcanzar el 10% del contenido de agua en una célula, es decir, 0.1 g de agua por cada gramo de masa seca; esta condición se alcanza con la exposición a temperaturas mayores de 28°C y 50% de humedad relativa en el aire, y se considera el punto en el cual el agua no es suficiente para rodear las macromoléculas en el interior celular por lo que las reacciones enzimáticas no se llevan a cabo, es decir, el

metabolismo se detiene por completo (Alpert, 2005; Potts, 1994).

El concepto de la desecación es muy diferente al de sequía, con el cual comúnmente se confunde. Alpert (2005) menciona que la sequía se refiere a la baja disponibilidad de agua en el ambiente de un organismo, mientras que, el término desecación se usa refiriéndose al bajo contenido de agua en sus células, por lo que muchos organismos pueden tolerar la sequía, a través de mecanismos de almacenamiento de agua como los cactus del desierto, sin embargo, mueren si son sometidos a desecación (Alpert, 2005).

Existe una relación muy cercana entre la tolerancia al estrés por desecación y la tolerancia a otros tipos de estrés, ya que los daños por desecación, son comparables con los daños causados por radiaciones ionizantes, por estrés hiperosmótico o por estrés oxidativo causado por la aparición de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante el proceso (Fredrickson *et al.*, 2008; Vriezen *et al.*, 2007).

I.3 Daños por desecación

Los daños que provoca el estrés por desecación van desde cambios morfológicos en la célula, hasta modificaciones irreversibles a nivel molecular.

Algunos cambios morfológicos incluyen el encogimiento y variación en la textura, forma y color por la oxidación de pigmentos, asimismo, se presentan alteraciones en el volumen de los compartimentos celulares, contracciones en las capas externas y cambios en la tensión superficial (Leslie *et al.*, 1995; Potts *et al.*, 2005).

Los daños letales en un organismo por la desecación son los daños a nivel de proteínas y ácidos nucleicos. Durante la desecación algunas moléculas pierden su conformación original y no vuelven a ser funcionales para la célula aún después de la rehidratación (Potts, 1994). Las células bacterianas acumulan el daño en el ADN y en casos extremos de exposición, la doble cadena de ADN se rompe (Fredrickson *et al.*, 2008).

Otra consecuencia del estrés por desecación es la pérdida de fluidez de la membrana celular ocasionada por el aumento de ácidos grasos trans durante el proceso (Kieft *et al.*, 1994; Halverson & Firestone, 2000), a este efecto se le conoce como transición a la fase de gel y ocurre a temperaturas a las cuales normalmente la membrana estaría en fase líquida cristalina si estuviera totalmente hidratada (Van de Mortel & Halverson, 2004), en

este cambio la membrana puede fisionarse y ser inhábil para sustentar la vida celular (Potts, 1994).

Como consecuencia de la pérdida excesiva de agua, la concentración de solutos intracelular aumenta rápidamente, de manera que durante la desecación la célula también se ve sometida a un estrés hiperosmótico (Vriezen *et al.*, 2007). Algunos estudios muestran que el incremento de NaCl en la célula puede inhibir la maquinaria de división celular, la síntesis de proteínas y la replicación del ADN (Ferjani *et al.*, 2003), así como inducir cambios a nivel transcripcional y afectar la estructura de la pared celular (Liu *et al.*, 2005).

Por otro lado, el análisis de las células desecadas de algunas cianobacterias mostró que contienen grandes cantidades de radicales libres (Potts, 1999), lo cual sugiere que durante el proceso de desecación, la célula también enfrenta daños por estrés oxidativo debido a la acumulación de ROS en el interior celular como superóxido (O_2^-), peróxido (H_2O_2) y radicales hidroxilo ($OH^\cdot$) (Potts, 1994).

El daño por estrés oxidativo se manifiesta con la alteración de la estructura de las proteínas y la peroxidación lipídica en la membrana, lo que conlleva la pérdida de la barrera de difusión a solutos impermeables y finalmente la lisis celular. El estrés oxidativo podría ser una de las principales consecuencias de la desecación, ya que la sola exposición al O_2 del aire influye notablemente en las reacciones fisiológicas, como la formación de radicales altamente reactivos, por ejemplo el hidroxilo, cuando reacciona con metales de transición como el hierro, esto se conoce como reacciones de Fenton e influyen fuertemente en la ruptura de la doble cadena de ADN (Potts, 1994).

Debido a lo anterior, la supervivencia de las bacterias en ambientes que presentan amplias fluctuaciones en la disponibilidad de agua, depende de su respuesta adaptativa mediante diversos mecanismos fisiológicos, estructurales y moleculares que les confieren la capacidad de resistir la desecación (Potts *et al.*, 2005).

I.4 Mecanismos de resistencia a la desecación

La resistencia a la desecación o anhidrobiosis (“vida sin agua”), es definida como la habilidad de sobrevivir a la pérdida total o parcial de agua intracelular sin sufrir un daño irreversible para recuperar el estado fisiológico normal tras la re-hidratación (Alpert, 2005).

La anhidrobiosis se encuentra ampliamente distribuida en todos los reinos biológicos; muchos animales microscópicos, microorganismos y plantas evolucionaron con mecanismos especiales que les permiten tolerar la desecación extrema y sobrevivir por periodos largos en un estado suspendido o desecado (Sun & Leopold, 1997; Leprince & Buitink, 2010).

La diversidad taxonómica de los organismos anhidrobióticos es tan amplia que sugiere que no hay rasgos filogenéticos o geográficos que determinen o limiten la tolerancia a la desecación en los seres vivos, incluso que esta habilidad de los anhidrobiontes no depende de la complejidad de los organismos (Alpert, 2005). Los únicos indicios del origen de la resistencia a la desecación en plantas, se han evidenciado a partir de los tejidos de las plantas de resurrección, los cuales sugieren un origen polifilético que surge mediante la adopción de mecanismos presentes en propágulos reproductivos (Leprince & Buitink, 2010).

Existen varios mecanismos que los organismos usan para sobrevivir a la pérdida de agua, en general incluyen la acumulación de proteínas hidrofílicas, antioxidantes y solutos compatibles, la producción de exopolisacáridos, formación de biofilm, modificación de la membrana y la transición a un estado viable no cultivable durante el estrés; todo a través de una compleja red transcripcional con la que se expresan distintos genes en respuesta al estrés (Potts, 1994; Cytryn *et al.*, 2007; LeBlanc *et al.*, 2008; Hernández-García, 2011). A todo el conjunto de genes involucrados en los mecanismos estructurales, fisiológicos y moleculares que permiten la tolerancia a la desecación, se le denomina “desicoma” (Potts, 2005).

I.4.1. Acuaporinas

Dentro de los mecanismos que confieren la resistencia a la desecación en las bacterias se encuentra el movimiento de agua mediante acuaporinas en los primeros instantes de la desecación (Corral-Lugo, 2010). Las acuaporinas responden al estrés modulando el flujo de agua en la célula cuando esta se enfrenta a diferentes tipos de estrés, principalmente a la deshidratación y congelación, los cuales conllevan un desbalance osmótico (Tanghe *et al.*, 2006). Incluso, se ha reportado que la expresión de acuaporinas en microorganismos PGPR es un factor importante para potenciar la resistencia a la desecación y salinidad de

la planta durante la interacción (Groppa *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que AqpZ media el transporte de agua hacia el interior y exterior de las células afectadas osmóticamente de *Escherichia coli*. Asimismo, la expresión de otras acuaporinas como AQY1 y AQY2 ha sido reportada en esferoblastos de *Saccharomyces cerevisiae* (Hohmann *et al.*, 2000), y se ha descrito que AQY1 desempeña una función importante en la expulsión de agua durante la esporulación, lo cual ayuda a liberar la presión de turgencia en la membrana y además contribuye a disminuir la actividad metabólica y propiciar el estado de dormancia de la spora (Sidoux-Walter *et al.*, 2004).

1.4.2 Proteínas LEA

Otras proteínas implicadas en la tolerancia a la desecación son las “proteínas LEA” (Late Embryogenesis Abundant Proteins), las cuales fueron descritas por primera vez en plantas, antes de que se reportaran también en animales, bacterias, cianobacterias y hongos (Hand *et al.*, 2011). Las proteínas LEA exhiben una notable habilidad para plegarse y desarrollar estructuras secundarias ordenadas conforme va ocurriendo la deshidratación; su conformación es mucho más estable y es por eso que se les atribuyen funciones de chaperonas y “escudos moleculares” durante el estrés (Chakrabortee *et al.*, 2007; Hand *et al.*, 2011).

Las proteínas LEA, se dividen en siete grupos de acuerdo a la similitud de sus secuencias aminoacídicas, que a su vez se caracterizan por tener secuencias motivo particulares (Battaglia *et al.*, 2008). Las del grupo 3, funcionan protegiendo a otras proteínas de la inactivación y agregación inducidas por la deshidratación y congelación; esto ha sido demostrado principalmente en los nematodos *Aphelenchus avenae* y *Caenorhabditis elegans* (Chakrabortee *et al.*, 2007), y recientemente se describieron las proteínas Ccor1 y Ccor2 involucradas en las respuestas adaptativas al congelamiento en el alga *Chlorella vulgaris* que habita en la Antártida (Liu *et al.*, 2011).

1.4.3 Solutos compatibles

El mecanismo más ampliamente documentado de resistencia a la desecación, es la síntesis de solutos compatibles. El término “solute compatible” se refiere a la habilidad de pequeños

compuestos orgánicos de bajo peso molecular para acumularse en las células en respuesta a los incrementos externos de la presión osmótica sin comprometer la fisiología celular (Empadinhas & da Costa, 2008).

Una gran variedad de organismos que incluyen plantas, archaeas, bacterias y cianobacterias, responden a los cambios en las concentraciones de sal del ambiente mediante la síntesis de solutos compatibles y su acumulación para contrarrestar la disminución de agua externa y la consiguiente disminución de la presión de turgencia interna (Empadinhas & da Costa, 2008).

Las moléculas que pueden funcionar como solutos compatibles incluyen algunos aminoácidos, azúcares simples, polialcoholes y sus derivados (Da Costa *et al.*, 1998; Gouffi *et al.*, 1998; Potts, 2005). La trehalosa, glicina-betaína y el α -glutamato son comúnmente sintetizados por varios organismos, mientras que, los polialcoholes se encuentran en hongos y algas, pero son muy raros en bacterias y aún desconocidos en archaeas (Santos & da Costa, 2002).

Existen numerosos estudios sobre el papel de distintos solutos compatibles en la protección de diferentes microorganismos que viven bajo condiciones de estrés, entre ellos destacan los relacionados a la síntesis de azúcares como la trehalosa, sacarosa y glucosa (Sugawara *et al.*, 2010; Gouffi *et al.*, 1998; Page-Sharp *et al.*, 1999) que ayudan a estabilizar la membrana, la síntesis de betaínas y ectoínas que ayudan al balance osmótico y la síntesis de algunos aminoácidos y sus derivados como el glutamato y la N-acetilglutaminilglutamina amida (NAGGN) que pueden acumularse intracelularmente o servir como señales para la producción de otros solutos compatibles (Gouffi *et al.*, 1998; Saum & Müller, 2008).

La trehalosa es acumulada en altas concentraciones (20% del peso seco total de la célula) por muchos organismos que sobreviven bajo deshidratación completa (Crowe *et al.*, 2001). Se trata de un disacárido no reductor que es sintetizado a partir de polímeros de glucosa unidos por enlaces $\alpha(1,4)$; se han reportado cuatro vías para la biosíntesis de trehalosa en procariotas mediadas por los genes *treS*, *treYZ*, *treH* y *otsAB* (Yoshida & Sakamoto, 2009; Sugawara *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que la síntesis y acumulación intracelular de trehalosa y sacarosa incrementa la fluidez de la membrana y se une a la superficie de las proteínas aumentando la tensión en la capa externa de estas, de tal manera que compensa la reducción de la

energía libre durante la desecación incrementando su estabilidad, y por lo tanto impide la desnaturalización de proteínas (Crowe, 2002; Pleitner *et al.*, 2012). Algunos estudios con *S. cerevisiae* demostraron que la trehalosa debe estar presente en ambos lados de la bicapa lipídica para estabilizar la membrana, por lo que las células que usan este mecanismo de protección cuentan con transportadores específicos para la trehalosa (Potts, 1994; Crowe, 2002).

Se ha encontrado que microorganismos termófilos e hipertermófilos, sintetizan solutos compatibles que aún no se han identificado en bacterias o archaeas que crecen bajo temperaturas moderadas, esto sugiere que tales solutos juegan un papel importante contra la desnaturalización térmica de las proteínas, algunos de los solutos compatibles reportados únicamente para este tipo de microorganismos extremófilos son el di-myo-inositol-1,1'-fosfato, manosilglicerato, manosilgliceramida, di-glicerol fosfato y di-manosil-di-myo-inositol-1,1'-fosfato (Santos & da Costa, 2002).

1.4.4. Producción de exopolisacáridos

Algunos estudios con *Salmonella enterica*, mostraron que el antígeno O del lipopolisacárido y las fimbrias son componentes cruciales para la resistencia a la desecación (Garmiri *et al.*, 2008), lo cual sugiere que las estructuras de la cubierta celular, desde las membranas interna y externa, así como la pared celular y polisacáridos excretados tienen una función importante en la resistencia a la desecación de las bacterias (Vanderlinde *et al.*, 2010).

Durante el estrés, algunas bacterias destinan su energía a la producción de exopolisacárido (EPS), esto ayuda a retener una mayor cantidad de agua y crea un microambiente más hidratado para la célula (Potts, 1994; Roberson & Firestone, 1992). Hay estudios que demuestran que las mutaciones en genes involucrados en la biosíntesis de exopolisacáridos disminuyen la tolerancia a la desecación como es el caso de *Rhizobium leguminosarum*, *Bradyrhizobium japonicum* y la cianobacteria *Nostoc commune*, en esta última, incluso se encontró que si se elimina el exopolisacárido, la actividad fotosintética sufre un daño significativo por la desecación (Vanderlinde *et al.*, 2010; Cytryn *et al.*, 2007; Van de Mortel & Halverson, 2004; Tamaru *et al.*, 2005).

Otros estudios han demostrado que la proteína CsgD controla la biosíntesis de celulosa extracelular y el desarrollo de la fimbria curli durante la desecación, las cuales son

requeridas para el establecimiento de biofilms en *Salmonella* para poder resistir al estrés (Gerstel & Römling, 2003; Spector & Kenyon, 2012). Se conoce que el factor sigma sigJ es un regulador clave para la síntesis de polisacáridos extracelulares en *Anabaena* sp. (Yoshimura *et al.*, 2007).

1.4.5. Osmoprotectores

Otro mecanismo que ha mostrado ser eficiente en la protección de bacterias sometidas a desecación, es el uso de osmoprotectores. Los osmoprotectores son sustancias que se adicionan de manera artificial a los microorganismos, a diferencia de los solutos compatibles que son sintetizados de *novo* en la célula (Gouffi *et al.*, 1998).

Uno de los principales objetivos del uso de osmoprotectores es la preservación de microorganismos, ya que los procesos de preservación a mediano y largo plazo como la congelación y la liofilización, implican un estrés a la célula (Morales-García *et al.*, 2010). El osmoprotector más utilizado es el glicerol, no obstante, otros osmoprotectores comúnmente utilizados por su efectividad son la trehalosa, lactosa, maltosa, y sacarosa, los cuales sustituyen a las moléculas de agua durante la liofilización (Leslie *et al.*, 1995).

Se ha observado que la hidroxiectoína protege mejor que la trehalosa a *Pseudomonas putida* y *Escherichia coli* de la desecación por liofilización (Manzanera *et al.*, 2002). Asimismo, algunos osmoprotectores como la glicina betaína, el dimetilsulfonioacetato, la colina, prolina y L-carnitina que fueron agregados exógenamente a *Pediococcus pentosaceus* y *Tetragenococcus halophila*, ayudaron a mejorar la supervivencia de tales bacterias cuando se sometieron a estrés osmótico (Baliarda *et al.*, 2003).

1.4.6 Antioxidantes y destoxificantes

Como se mencionó anteriormente, una de las consecuencias de la desecación es la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las células enfrentan el estrés por ROS mediante la expresión de un sistema de respuesta que incluye tanto antioxidantes como enzimas destoxificantes que reducen los puentes disulfuro causados por el estrés oxidativo como las glutatión reductasas, hidroperoxidasas, agentes reductores y proteínas involucradas en el reparo del DNA y proteínas (Matallana-Surget *et al.*, 2012).

Se ha reportado que en *B. japonicum* se expresan genes que codifican para superóxido dismutasas y peroxidasas durante las primeras horas de la desecación (Cytryn, 2007). La inducción de antioxidantes en respuesta a la desecación también ha sido reportada en macroalgas de la zona intermareal que se ven expuestas a deshidratación por los cambios de marea (Flores-Molina *et al.*, 2014).

El uso de antioxidantes contra el estrés oxidativo generado durante la desecación ha sido ampliamente reportado en plantas ya que los cloroplastos en particular son muy sensibles al daño oxidativo, es por esto que las plantas deben prevenir la formación de radicales libres. Se ha descrito mediante análisis transcriptómicos y proteómicos en plantas sensibles a este estrés, que los genes que codifican para enzimas involucradas en el metabolismo del glutatión son los genes más sensibles al proceso de deshidratación (Toldi *et al.*, 2009), y por otro lado, se ha observado que en *Myrothamnus flabellifolia*, una planta africana altamente resistente a la desecación, los niveles de glutatión se elevan notoriamente durante el estrés (Kranner *et al.*, 2002).

Algunos antioxidantes que forman parte del sistema de defensa contra el oxígeno reactivo en plantas, son el ascorbato, glutatión, β -caroteno y α -tocopherol, así como las catalasas, superóxido dismutasas, glutatión reductasas y ascorbato peroxidasas que participan en la eliminación del oxígeno reactivo (Collén & Davison, 1999). De estos, se ha demostrado que el glutatión no solo funciona como antioxidante, sino también interviene en varias funciones de la célula que incluyen la defensa contra la presencia de xenobióticos, el control de la actividad enzimática, la expresión de genes y la transducción de señales (Smirnova *et al.*, 2012).

1.4.7 Sistemas de reparación del ADN

Durante el estrés, la célula debe reparar el daño al ADN mediante la expresión de distintos genes; la funcionalidad del ADN reparado y de los sistemas de replicación, determinan si la célula vive o muere (Fredrickson *et al.*, 2008).

Se han descrito algunos genes que se expresan 8 veces más durante la desecación que en condiciones normales de humedad relativa, estos están implicados en la modificación, reparación y transposición del ADN en *Rhizobium jostii* y *B. japonicum*, e incluyen una proteína contra estrés oxidativo (DpsI) y dos genes codificantes para factores sigma (*sigF1*

y *sigF3*) involucrados en la respuesta regulatoria al estrés (LeBlanc, 2008).

Se ha observado también que el factor transcripcional RpoN se activa y se encarga de regular la transcripción de genes involucrados en responder al estrés oxidativo (Cyrtryn, 2007).

Un caso particular en el que la expresión de genes para reparar el daño al ADN causado por la desecación, es el de *Mycobacterium tuberculosis*, en el cual es de crucial importancia para sobrevivir a las condiciones variantes dentro del hospedero (Warner, 2010). Se han reportado también diversos mecanismos para algunos patógenos como *Salmonella entérica*, *Neisseria meningitidis* y *Helicobacter pylori* (Ambur *et al.*, 2009). Muchos de estos genes incluyen metiltransferasas, desmetilasas oxidativas, adenina glicosilasas, topoisomerasas, helicasas, endonucleasas y polimerasas (Ambur *et al.*, 2009).

1.4.8 Modificación de membrana

Cuando el agua es removida de la membrana durante la desecación, las cabezas polares de los lípidos se ven forzadas a permanecer más cercanas unas a otras, esto incrementa la interacción de fuerzas de Van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos adyacentes, forzando a la membrana a pasar de la fase líquida cristalina a la fase de gel, con lo cual la fluidez de la membrana disminuye (Scherber *et al.*, 2009).

Se ha sugerido que uno de las principales respuestas de la membrana celular durante el estrés, es la isomerización de ácidos grasos monoinsaturados *cis* en *trans* (Halverson & Firestone, 2000; Van de Mortel & Halverson, 2004). Un análisis mostró que hay un gran incremento en la isomerización *cis-trans* en *P. putida* DOT-T1E en presencia de tolueno, así como un incremento en el contenido de cardiolipina (Junker & Ramos, 1999).

Se ha reportado también que los ácidos grasos ciclopropano de la membrana están involucrados en la resistencia a diversos tipos de estrés, ya que estabilizan los lípidos de membrana e impiden su degradación. Muñoz-Rojas y colaboradores (2006) demostraron que el aumento en los niveles de ciclopropano se correlaciona con el incremento en la tasa de supervivencia durante la fase estacionaria en *P. putida* KT2440 cuando es sometida a liofilización. Otros estudios mostraron que la sobreexpresión de ciclopropano incrementa la resistencia a ácidos y solventes en *Clostridium acetobutylicum* (Zhao *et al.*, 2003).

1.4.9 Estado viable no cultivable

Muchas bacterias suelen entrar a una etapa de dormancia denominada “estado viable no cultivable” (VBNC por sus siglas en inglés) cuando se ven sometidas a un estrés por tiempo prolongado. Oliver (2005) define este estado como la condición fisiológica en la que las bacterias no crecen en los medios de cultivo de rutina en los que normalmente deberían crecer, sin embargo, están vivas y son capaces de renovar su actividad metabólica. Pese a que el número de unidades formadoras de colonia decrece notablemente, puede demostrarse por otros métodos que las células están vivas incluso si no son capaces de desarrollar colonias en el medio de cultivo.

El estado viable no cultivable puede ser inducido por diversos tipos de estrés como la falta de nutrientes (Cook & Bolster, 2007; Amel *et al.*, 2008), la temperatura fuera del rango óptimo de crecimiento (Wong & Wang, 2004; Vattakaven *et al.*, 2006), el estrés osmótico (Wong & Liu, 2008; Darcan *et al.*, 2009), la concentración de oxígeno (Kana *et al.*, 2008), la presencia de metales pesados (Grey & Steck, 2001; Alexander *et al.*, 1999; Ordax *et al.*, 2006) y la desecación como recientemente se ha demostrado en *P. putida* KT2440 (Pazos-Rojas, 2011). El estado VBNC es reversible una vez que la célula deja de someterse al estrés (Bates & Oliver, 2004), lo cual, además de ser la principal diferencia con los organismos no resistentes, se conoce como “resucitación” o “vuelta al estado viable cultivable”.

Un análisis proteómico en *Enterococcus faecalis* mostró que existen algunos genes que son reprimidos para reducir la actividad metabólica, como los que codifican para enolasas involucradas en la glucólisis, ATP sintasas que participan en la fosforilación oxidativa y factores de elongación involucrados en la síntesis de proteínas y el crecimiento celular (Lleò *et al.*, 2000).

Pese a la reducida actividad metabólica durante este estado, la célula continúa con la transcripción de genes y la producción de ARNm. Un estudio demostró que la presencia de antibióticos induce el estado VBNC en *E. faecalis*, y durante este periodo, aumentan los niveles de proteínas PBP 3 y 5 involucradas en los últimos pasos de la síntesis de peptidoglicano (Lleò *et al.*, 2000; Signoretto *et al.*, 2000), lo cual concuerda con el hecho de que la morfología de la envoltura celular se ve modificada durante este estado de dormancia y requiere ser reparada (Signoretto *et al.*, 2000).

Estudios recientes han evidenciado que la mutación de la proteína GST (Glutación S-transferasa), impide a *Vibrio vulnificus* entrar al estado VBNC (Abe *et al.*, 2007). La relación de este estado con el estrés oxidativo, se hizo más evidente cuando fue demostrado que la catalasa codificada por el gen *katG*, disminuyó su expresión mientras *V. vulnificus* permanecía en estado VBNC al someterse a bajas temperaturas, no obstante, después de remover el estrés, la resucitación de la bacteria se caracterizó por la expresión total de *katG* (Oliver, 2010).

Varios aspectos moleculares de este estado fisiológico aún se están elucidando, no obstante, está claro que para muchas especies bacterianas que no esporulan, incluidas muchas especies patógenas para el humano, el estado VBNC es una estrategia adaptativa que les permite persistir en el hospedero y distintos ambientes (Li *et al.*, 2014; Oliver, 2010).

1.5 Aplicaciones biotecnológicas de la tolerancia a la desecación

La búsqueda de la resistencia a la desecación en distintos organismos ha sido de gran utilidad en diversos campos de la biotecnología. Particularmente, la ingeniería anhidrobiótica es una rama dedicada a transferir la resistencia a la desecación a otros organismos que son sensibles a este estrés; esto tiene un gran potencial para la preservación de microorganismos dado que varios métodos y técnicas de conservación implican el congelamiento y la deshidratación (Manzanera *et al.*, 2002; Bjerketorp *et al.*, 2006).

En la industria biotecnológica, muchos de estos organismos anhidrobiontes se usan para la producción de solutos compatibles y proteínas que puedan ser usados como osmoprotectores en otros microorganismos y plantas (Apse & Blumwald, 2002). Se ha demostrado que las proteínas LEA de tomate, trigo y cebada confieren mayor tolerancia al estrés osmótico y la congelación cuando se introducen en *Sacharomyces cerevisiae* (Toldi *et al.*, 2009), incluso, algunos solutos compatibles como la betaína se usan para mejorar la amplificación de ADN de alto contenido de GC durante la PCR, ya que se emplean temperaturas muy elevadas (Chakrabarti *et al.*, 2001; Schnoor *et al.*, 2004).

Sin duda el mayor potencial biotecnológico es para la agricultura, ya que existen numerosos estudios que buscan hacer resistentes a la desecación a distintas plantas de interés comercial mediante el uso de antioxidantes, proteínas LEA y solutos compatibles que son

ingresados a las plantas mediante la transformación genética (Toldi *et al.*, 2009; Leprince & Buitink, 2010). Como en el caso de la planta de Tabaco, en la cual se demostró que la sobreexpresión de algunos antioxidantes incrementa su crecimiento bajo una gran variedad de condiciones estresantes (Roxas *et al.*, 2000). Por otro lado, a través de la ingeniería metabólica, se han realizado intentos para lograr que distintas plantas acumulen azúcares protectores contra la desecación (Garg *et al.*, 2002).

Asimismo, la ingeniería anhidrobiótica ha resultado ser útil en la investigación del uso de bacterias PGPR resistentes a la desecación para la biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en suelos sujetos a sequía (Vilchez & Manzanera, 2011), lo cual se considera una buena alternativa para la reforestación de suelos desérticos (Bashan *et al.*, 2009).

Por otro lado, en el área médica, algunos experimentos con líneas celulares humanas, han demostrado que la expresión de proteínas LEA reduce la agregación de proteínas asociada a enfermedades neurodegenerativas (Chakrabortee *et al.*, 2007).

II. Antecedentes

Se ha sugerido que la cointeracción entre las bacterias que integran un inoculante, podría resultar benéfica tanto para las especies que integran la formulación como para el efecto promotor del crecimiento en las plantas en las que se aplica, tal y como indican algunos estudios sobre la coinoculación de plantas con bacterias del género *Azospirillum* y *Rhizobium*, los cuales han demostrado que existe un efecto sinérgico entre las dos bacterias ya que *Azospirillum* estimula la formación de nódulos en *Rhizobium* y por lo tanto, se obtiene un mayor crecimiento y rendimiento de las plantas en contraste a cuando se realiza la inoculación con una sola especie bacteriana (Bashan, 1998; Bashan & Holguin, 1998).

El laboratorio de Ecología Molecular Microbiana (LEMM) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla ha desarrollado un inoculante multiespecies (EMMIM-1) que incluye bacterias del tipo PGPR aisladas de distintos ambientes (Morales-García, 2011), *Pseudomonas putida* KT2440, forma parte de este inoculante por ser buena promotora del crecimiento en plantas.

Por otra parte, el LEMM también cuenta con una cepa altamente resistente a la desecación (*Klebsiella variicola* T29A2) aislada de caña de azúcar, que ha sido ampliamente utilizada como modelo de estudio en diversos trabajos referentes a la tolerancia a este estrés.

II.1 *Klebsiella variicola* T29A2

Muchas especies del género *Klebsiella* han demostrado ser promotoras del crecimiento ya que proporcionan gran parte del nitrógeno que necesitan las plantas a través del proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Martínez *et al.*, 2004; Fouts *et al.*, 2008). Particularmente, *Klebsiella variicola* T29A2, aislada de caña de azúcar, podría promover el crecimiento de plantas mediante la FBN y la producción de ácido indol-acético (López-Reyes, 1996; Rosenblueth *et al.*, 2004; Silvana *et al.*, 2006).

K. variicola T29A2 es una bacteria Gram negativa no fermentadora de adonitol (Rosenblueth *et al.*, 2004); al igual que otras bacterias de su género, carece de flagelos y presenta una cápsula formada por exopolisacáridos complejos que recubren y protegen la superficie celular (Fouts *et al.*, 2008).

Recientemente, se ha encontrado que *K. variicola* T29A2 es resistente a la desecación (Muñoz-Rojas *et al.*, 2008), e incluso, se ha demostrado que lo hace con elevadas tasas de supervivencia (Corral-Lugo, 2010). Algunos genes implicados en la resistencia a la desecación de *K. variicola* T29A2 fueron caracterizados a partir de 15 mutantes sensibles a la desecación e identificados como codificantes para diversas funciones como monooxigenasa, nitrogenasa, proteína formadora de pilus, dihydroortasa, ATPasa secretora, acetiltransferasa, proteína exportadora de solutos, formadora de exopolisacárido, glutamato sintasa, activador del operón cadC y un regulador del operón arabinosa. Estudios recientes, demostraron que los genes que desempeñan una función determinante en la resistencia a la desecación de *K. variicola* T29A2 son los implicados en la síntesis de exopolisacáridos y la glutamato sintasa e incluso, estos dos genes participan también en la resistencia al estrés por congelación (Corral-Lugo, 2010; Rodríguez-Andrade, 2011).

En general, las bacterias del género *Klebsiella* son buenos modelos de estudio de la interacción con plantas debido a la gran variedad de ambientes a partir de los cuales se han aislado (Matsen *et al.*, 1974). Aunado a esto, el LEMM cuenta con una banca de 8,974 mutantes de *K. variicola* T29A2, que aún están sin explorarse para identificar nuevos genes involucrados en la resistencia a diversos tipos de estrés, incluido el estrés por desecación.

II.2 *Pseudomonas putida* KT2440

P. putida KT2440 es una bacteria saprófita Gram negativa de la clase de las Gammaproteobacterias, que ha sido reconocida por su habilidad para mineralizar compuestos orgánicos complejos. Diversos estudios han demostrado que esta especie es capaz de degradar tolueno, benzoato, compuestos fenólicos e incluso hidrocarburos policíclicos aromáticos (Margesin & Schinner, 2001; Ramos-González *et al.*, 2001; Jiménez *et al.*, 2002).

Por otro lado, se ha demostrado que esta cepa también es promotora del crecimiento en plantas ya que incrementa el crecimiento del maíz criollo (Morales-García *et al.*, 2011) y posee una buena capacidad colonizadora de las raíces de algunas plantas como maíz, trigo, fresa, caña de azúcar y espinacas persistiendo en la rizósfera con altas densidades poblacionales (Espinosa-Urgel *et al.*, 2002; Molina *et al.*, 2000).

El genoma completo de *P. putida* KT2440 ha sido analizado, secuenciado y publicado, demostrando que no es una bacteria patógena (Nelson *et al.*, 2002), tiene alrededor de 6 Mb de longitud y un contenido de GC del 60% (Ramos-Díaz & Ramos, 1998; Stjepandic *et al.*, 2002); esta cepa no posee plásmidos, aunque puede adquirirlos libremente de otras bacterias y expresarlos, sin embargo no actúa como donadora del DNA introducido a menos que se introduzcan también las funciones de transferencia, por lo que en 1982, *P. putida* KT2440 fue declarada como la primera cepa biosegura para la clonación de genes en bacterias Gram negativas del suelo (Timmis, 2002; Stjepandic *et al.*, 2002).

P. putida KT2440 se distribuye ampliamente en una gran variedad de ambientes, que incluyen regiones templadas, aerobias y semiaerobias tanto del suelo como de hábitats acuáticos (Timmis, 2002). En general, se menciona que la causa de la colonización de la gran variedad de hábitats reside en la habilidad de las pseudomonadáceas para adherirse prolongadamente a partículas sólidas, su movilidad, y su versatilidad metabólica al usar compuestos naturales y xenobióticos como fuentes de carbono, nitrógeno, azufre y fósforo (Duque *et al.*, 2007).

Debido a que el ambiente del suelo se caracteriza por presentar una elevada heterogeneidad en su composición química, estructura, osmolaridad, fuerza iónica, pH y concentración de oxígeno, se considera que *P. putida* KT2440 es una especie con alto grado de adaptabilidad a diversas condiciones fisico-químicas, lo cual le ha permitido colonizar diversos ambientes (Timmis, 2002).

Las características anteriores hacen de *P. putida* KT2440 una especie de gran potencial biotecnológico en el área agrícola, ya que representa una buena alternativa para la biorremediación de compuestos xenobióticos (Duque *et al.*, 2007) y la promoción del crecimiento en plantas. Asimismo, gracias al amplio conocimiento de su genoma, es un buen modelo para realizar diversos estudios.

Pese a tales ventajas, algunos estudios han mostrado que *P. putida* KT2440 es sensible a la desecación (Muñoz-Arenas *et al.*, 2006; Muñoz-Rojas *et al.*, 2008). Estudios realizados por Manzanera y colaboradores (2002) demuestran que una recombinante de *P. putida* KT2440 no es capaz de sintetizar suficientes concentraciones de trehalosa para resistir la desecación por liofilización.

Por otra parte, Muñoz-Rojas y colaboradores (2006) mencionan que algunos disacáridos

pueden proteger a *P. putida* KT2440 de la liofilización. También se ha demostrado que en presencia de algunos exudados rizosféricos o en asociación con las raíces de algunas variedades de plantas de maíz, *P. putida* KT2440 puede sobrevivir a condiciones de desecación ambiental (Pazos-Rojas, 2011; Muñoz-Arenas, 2011).

III. Justificación

La exposición a la desecación por la escasez de agua en regiones de cultivo áridas o semiáridas, es uno de los factores limitantes más importantes para lograr que las bacterias de un inoculante cumplan su función benéfica. Debido a que no todas las bacterias con habilidades de promoción del crecimiento tienen la capacidad de resistir a la desecación, es un desafío elaborar inoculantes que contengan especies con funciones benéficas y que a la vez sean capaces de resistir periodos prolongados de desecación.

Un objetivo importante de la búsqueda de la resistencia a la desecación en este tipo de bacterias, es tener la certeza de que al ser inoculadas en el campo, mantendrán su viabilidad hasta lograr interactuar molecularmente con la planta y favorecer su crecimiento.

Hemos visto de acuerdo a lo anterior, que pese a ser una bacteria sensible a la desecación, *P. putida* KT2440 puede sobrevivir a este estrés mediante la adición de algunas sustancias. El interés por utilizar como modelos de estudio a *K. variicola* T29A2 y *P. putida* KT2440, tiene como finalidad, explorar la capacidad de una bacteria resistente a la desecación, para proteger a otra sensible cuando interactúan antes o durante el estrés; esto permitirá conocer un mecanismo diferente para proteger a *P. putida* KT2440 de la desecación sin la adición exógena de otras sustancias.

Al ser *P. putida* KT2440 una cepa de gran interés por sus habilidades de biorremediación, adherencia, colonización, alto grado de adaptabilidad, así como la disponibilidad de su secuencia genómica completa para su estudio, además de ejercer la promoción del crecimiento en plantas; es importante lograr que resista periodos largos de desecación de manera eficiente para ser utilizada en nuevas y mejores formulaciones bacterianas.

En vista de que las nuevas generaciones de inoculantes se basan en la adición de más de una sola especie bacteriana, la identificación de una propiedad como la que se busca en este estudio, facilitará el mantenimiento de la viabilidad de las bacterias de la formulación

sin necesidad de la adición de osmoprotectores y otras sustancias que encarecen el producto, mejorando también el crecimiento de la planta en las que es aplicado e incrementando la producción. En ese sentido, la habilidad de una bacteria resistente a la desecación para conferir tolerancia a una bacteria PGPR que es sensible, tiene un gran potencial biotecnológico y numerosas aplicaciones agrícolas.

Cabe resaltar que hallar mecanismos naturales de protección o de resistencia a este estrés, es de gran importancia, ya que desde hace casi dos décadas ha habido una gran controversia respecto a la siembra de variedades de maíz transgénico resistente a diferentes tipos de estrés; diversas organizaciones en México han presentado iniciativas de ley o modificaciones en defensa de las variedades de maíz criollo. En este sentido, el uso de inoculantes bacterianos con especies nativas no modificadas genéticamente para incrementar el crecimiento del maíz así como de otras plantas de interés comercial, ha sido una propuesta sustentable para mejorar la producción de maíz criollo y competir con algunas variedades transgénicas que tienen una mayor velocidad de crecimiento.

Por otra parte, es importante considerar que la resistencia a la desecación en microorganismos, es una habilidad deseada no solamente por su aplicación para mejorar la productividad, sino también para la restauración de suelos contaminados y la reforestación de suelos desérticos.

Fuera del contexto agrícola, este estudio contribuye también al conocimiento de nuevos mecanismos de resistencia a la desecación que aún no han sido descritos, incluso, en el contexto ecológico, podrá entenderse por qué algunas bacterias que se consideran sensibles a la desecación, están presentes en zonas áridas o semidesérticas, como es el caso de *P. putida*, que es bastante reconocida por colonizar una gran variedad de ambientes.

Finalmente, la identificación de genes de resistencia al estrés por desecación, permitirá conocer el tipo de sustancias que pueden ser usadas para el almacenamiento y conservación de otros microorganismos a largo plazo.

IV. Hipótesis

La interacción de *K. variicola* T29A2 (resistente a desecación) con *P. putida* KT2440 (sensible a desecación) antes y/o durante el estrés, contribuirá a mantener la supervivencia de *P. putida* KT2440.

V. Objetivos

Objetivo general:

Explorar la capacidad de *K. variicola* T29A2 para proteger a *P. putida* KT2440 del estrés por desecación.

Objetivos particulares:

1. Determinar la supervivencia a la desecación de *K. variicola* T29A2 y *P. putida* KT2440 cuando cointeraccionan antes y durante el estrés.
2. Evaluar la capacidad de mutantes de *K. variicola* T29A2 para proteger a *P. putida* KT2440 de la desecación.
3. Identificar los genes de *K. variicola* T29A2 involucrados en la protección de *P. putida* KT2440.

VI. Método

VI.1. Diseño de medios selectivos

Como etapa preliminar, se diseñaron y probaron alrededor de 80 medios de cultivo que permitieran distinguir a *K. variicola* T29A2 de *P. putida* KT2440 y viceversa, para poder monitorear la supervivencia de cada una, ya que durante los experimentos de co-interacción, ambas bacterias se sometieron al estrés juntas.

El diseño de los medios de selección se realizó con base en la observación del crecimiento de ambas bacterias en medios de cultivo elaborados con distintas fuentes de carbono así como con la adición de antibióticos y metales pesados a diferentes concentraciones (Anexo 1). La Tabla I muestra los medios de selección utilizados para *P. putida* KT2440 y *K. variicola* T29A2.

Tabla I. Medios de selección utilizados en este estudio.

	<i>P. putida</i> KT2440		<i>K. variicola</i> T29A2	
Medio de cultivo	Citrato de Simons		Agar McConkey	
Antibiótico	Cm 150 µg/ml		Distinción morfológica	
Composición	Fosfato dibásico de amonio	1 g/L	Peptona de caseína	1.5 g/L
	Fosfato dipotásico	1 g/L	Peptona de gelatina	17 g/L
	Cloruro de Sodio	5 g/L	Peptona de carne	1.5 g/L
	Citrato de Sodio	2 g/L	Lactosa	10 g/L
	Sulfato de magnesio	0.02 g/L	Sales biliares	1.5 g/L
	Azul de bromotimol	0.08 g/L	NaCl	5.0 g/L
	Agar	15 g/L	Rojo neutro	0.03 g/L
	pH = 6.9 ± 0.2		Cristal violeta	0.0001 g/L
			Agar	13.5 g/L
			pH = 7.1 ± 0	

Debido a que tanto *K. variicola* T29A2 como *P. putida* KT2440 toleran diversos antibióticos, la selección de *K. variicola* T29A2 se realizó mediante la observación morfológica, ya que la característica de absorber el colorante rojo del medio agar McConkey, la hace claramente distinguible de *P. putida* KT2440 sin necesidad de adicionar antibiótico.

VI.2. Antagonismo bacteriano

Posteriormente, se realizaron pruebas de inhibición simultánea entre ambos modelos de estudio, para descartar la posibilidad de que alguna de las dos cepas produjera sustancias inhibitorias que impidieran la realización de los experimentos de desecación en co-interacción.

Cada bacteria se sembró por separado en medio líquido LB con sus respectivos antibióticos de selección, los cultivos se crecieron en agitación por 24 horas a 200 rev/min y 30 °C. Después se tomaron 100 µl del cultivo de una de las bacterias (considerada como sensible) y fueron plaqueados con un asa de vidrio en placas de LB dejándolas secar por 10 min, posteriormente, se agregaron 50 µl de la segunda bacteria (considerada como posible productora de sustancias inhibitorias) con un micropipeta en el centro de la placa. Finalmente, las placas se incubaron por 24 horas a 30 °C. El procedimiento se realizó nuevamente invirtiendo la posición de las bacterias. En cada prueba se analizaron tres réplicas, considerándolas positivas cuando se observó la presencia de halos de inhibición y negativas cuando ambas bacterias crecieron.

Las pruebas se consideraron negativas al no haber observado halos de inhibición, lo que indicó que ninguna de las dos bacterias produce sustancias inhibitorias que afecten el crecimiento de la otra (Fig. 1).

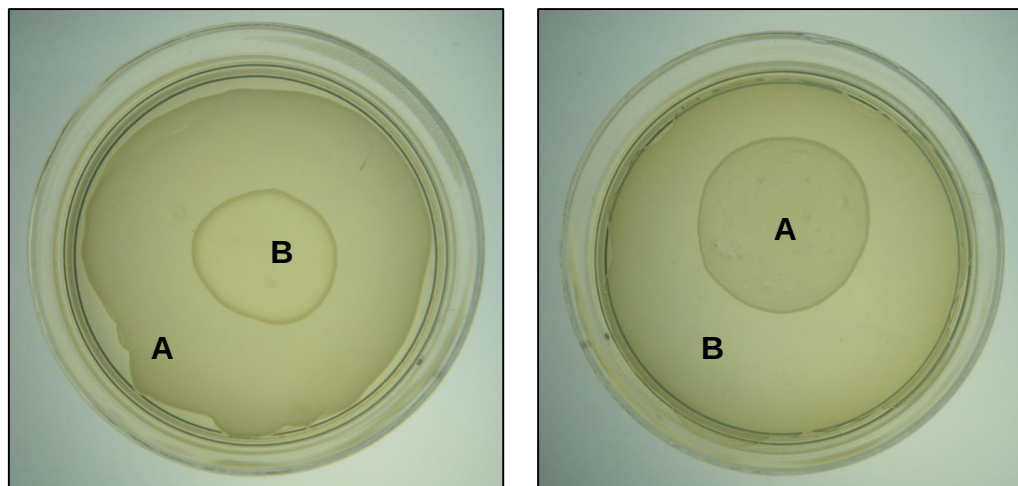


Figura 1. Pruebas de inhibición simultánea entre *K. variicola* T29A2 y *P. putida* KT2440. A) *K. variicola* T29A2. B) *P. putida* KT2440.

VI.3. Experimentos de cointeracción y desecación

La habilidad protectora de *K. variicola* T29A2, se avaluó mediante dos experimentos diseñados con el fin de observar si el efecto protector se cumple cuando la cointeracción entre bacterias ocurre durante la exposición al estrés o bien, si este ocurre cuando las bacterias cointeraccionan antes de someterse al estrés. En ambos casos, *K. variicola* T29A2 y *P. putida* KT2440 se crecieron hasta fase estacionaria en medio líquido LB durante 24 horas a 30 °C y en agitación a 200 rev/min. Posteriormente las células fueron lavadas por centrifugación dos veces a 5,000 rev/min a 25 °C durante 10 min para eliminar el medio de cultivo y se re-suspendieron en el mismo volumen de agua estéril.

VI.3.1 Cointeracción durante el estrés

Los cultivos de cada bacteria se crecieron hasta fase estacionaria de manera independiente y posteriormente fueron lavados por centrifugación para realizar una mezcla con el mismo volumen del cultivo de cada bacteria re-suspendido en agua estéril. Cabe destacar que en este primer diseño experimental, las bacterias no interactuaron hasta después de ser lavadas y re-suspendidas en agua, por lo que se considera que la interacción ocurre únicamente en el momento en el que serán sometidas al estrés (Fig. 2A).

VI.3.2 Cointeracción antes del estrés

El segundo diseño experimental, a diferencia del primero, consistió en crecer juntas a ambas bacterias desde un inicio bajo las mismas condiciones por 24 horas, y una vez en fase estacionaria, las células se lavaron por centrifugación y se re-suspendieron en agua estéril, con lo cual se considera que la interacción de las dos bacterias ocurrió antes de ser sometidas al estrés (Fig. 2B).

Una vez que las células fueron lavadas, tanto en VI.3.1 como en VI.3.2, se tomaron alícuotas de 500 µl y se distribuyeron en tubos eppendorff, los cuales fueron pesados y sellados con tapones de algodón para permitir la entrada de aire y evaporación del agua. Las muestras se almacenaron en una cámara de desecación previamente diseñada y aclimatada a 30 °C y 50% de humedad relativa por 18 días.

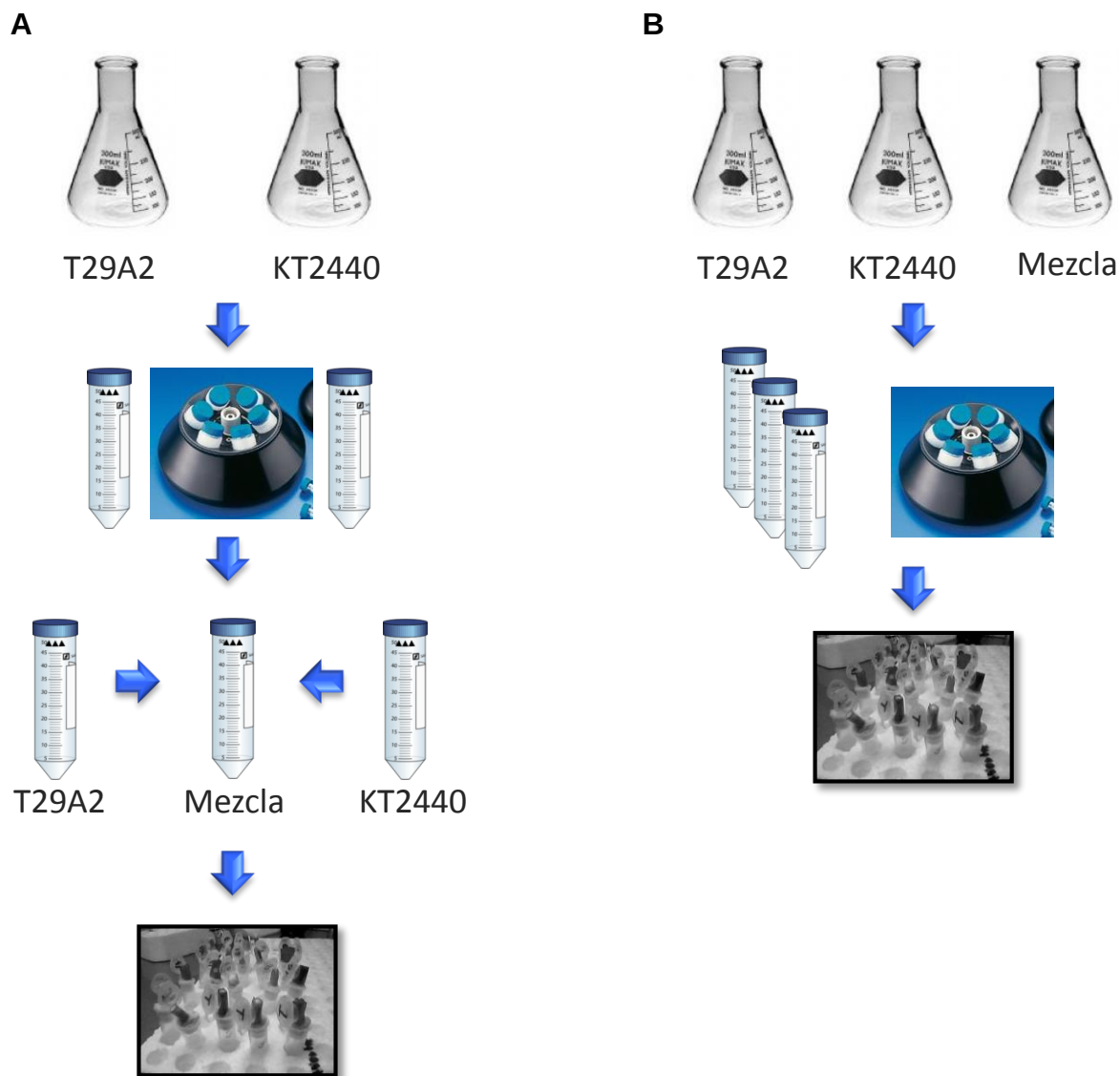


Figura 2. Diseño experimental para evaluar dos tipos de cointeracción entre *K. variicola* T29A2 y *P. putida* KT2440. A) Cointeracción durante el estrés. B) Cointeracción antes del estrés.

VI.3.3 Cointeracción con mutantes de *K. variicola* T29A2

Posteriormente, se realizaron experimentos de cointeracción entre *P. putida* KT2440 y mutantes de *K. variicola* T29A2 con la finalidad de identificar algunos genes involucrados en la protección de la bacteria sensible contra la desecación. Dichas mutantes fueron obtenidas por mutagénesis al azar con el transposón mini-Tn5 (Corral-Lugo, 2010).

Para ello, se diseñó un método rápido para evaluar el efecto protector de varias mutantes a la vez. Este método consistió en crecer juntas a cada una de las mutantes en co-interacción con *P. putida* KT2440 durante 24 horas. Posteriormente, cada una de las mezclas fue centrifugada y resuspendida en agua estéril. Una vez removido el medio de cultivo, se colocaron 100 µl de cada mezcla en cada uno de los 96 pozos de una placa multipozos (ELISA), incluyendo los respectivos controles que corresponden a *P. putida* KT2440, *K. variicola* T29A2 (silvestre) y una mezcla con *K. variicola* T29A2 y *P. putida* KT2440 (Fig. 3A).

Las muestras se distribuyeron como se indica en la figura 3B, se colocaron tres réplicas de cada una y las placas se ingresaron a la cámara de desecación durante cinco días bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad que los experimentos de desecación estándar.

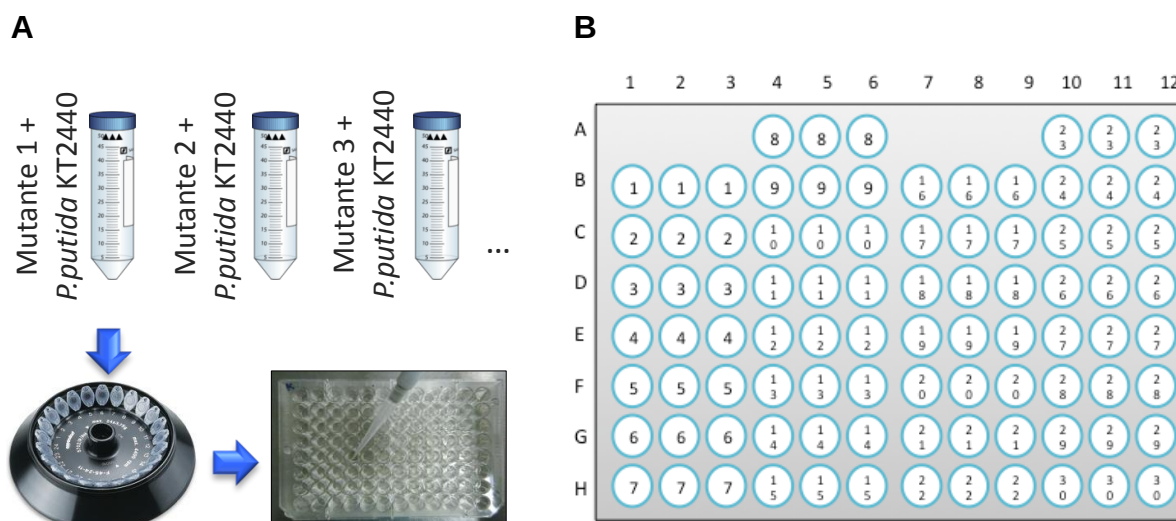


Figura 3. Método rápido para evaluar la supervivencia a la desecación de mutantes de *K. variicola* T29A2 en cointeracción con *P. putida* KT2440. A) Diseño experimental. B) Distribución de las muestras.

VI.4 Tasa de Supervivencia Bacteriana

Durante los 18 días de desecación, se realizó el monitoreo de la supervivencia de ambas bacterias mediante la técnica de goteo por sellado en placa masivo (Corral-Lugo *et al.*, 2012) antes de ser sometidas al estrés y posteriormente cada tercer día en los medios de selección correspondientes. En cada monitoreo se analizaron cinco réplicas de cada tratamiento y se determinó la tasa de supervivencia bacteriana (BSR), definida como la relación entre el logaritmo del número de UFC/ml presentes en la suspensión después de la desecación (D.D) y el logaritmo del número de células viables antes de la desecación (A.D.), como se muestra en la siguiente función:

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

Donde:

D.D. = después de la desecación

A.D. = antes de la desecación

Para monitorear la supervivencia de *P. putida* KT2440 en cointeracción con las mutantes de *K. variicola* T29A2, primero se realizó el sellado de las muestras con un replicador de 48 dientes en los medios de selección correspondientes a los cinco días de desecación. Después de incubar las placas durante 24 horas, se ubicaron las muestras en las que *P. putida* KT2440 no sobrevivió a la desecación, a partir de las cuales, se eligieron las mutantes que al no proteger a *P. putida* KT2440 del estrés, posiblemente están mutadas en genes involucrados en la transferencia de la resistencia a la desecación.

Para corroborar que las mutantes seleccionadas mediante el método rápido fueran las de interés, se realizaron nuevamente los experimentos de desecación pero a través del método estándar y se monitoreó la supervivencia tanto de *P. putida* KT2440 como de la mutante de interés como se describió anteriormente.

El análisis estadístico de las tasas de supervivencia obtenidas, se realizó con el programa Sigma Plot 3.0 mediante pruebas *t*-student.

VI.5 Comprobación de la inserción del transposón mini-Tn5 en mutantes de *K. variicola* T29A2.

Debido a que la banca de mutantes de *K. variicola* T29A2 fue realizada por mutagénesis al azar con el plásmido pUT-km, portador del transposón mini-Tn5, se corroboró que las mutantes seleccionadas tuvieran dicho transposón para su posterior análisis mediante PCRs arbitrarias.

En primera instancia, se extrajo el ADN total de las mutantes de interés así como de *P. putida* KT2440 y *K. variicola* T29A2 silvestre, mediante el protocolo de extracción del kit “Wizard® Genomic DNA Purification” (PROMEGA). Las mezclas de PCR se realizaron con el componente Go Taq® Green Master Mix.

La comprobación se hizo mediante la amplificación del gen de resistencia a kanamicina que porta el transposón como marcador. Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes, con los cuales se amplificó un fragmento de 428 pb:

KmA - TATGCCTCTTCCGACCATCA

KmB - CCGACTCGTCCAACATCAAT

Las condiciones de amplificación se establecieron de acuerdo a Toribio-Rosales (2009):

95 °C	3 ‘	32 ciclos
95 °C	1 ‘	
64 °C	1 ‘	
72 °C	1 ‘	
72 °C	5 ‘	

VI.6 PCRs arbitrarias

Una vez que se corroboró lo anterior, se utilizó el ADN de las mutantes de interés para identificar los genes truncados en tales mutantes por la inserción del transposón mediante PCRs arbitrarias. La técnica de PCRs arbitrarias consiste en amplificar una región adyacente al transposón mini-Tn5 correspondiente a un fragmento del gen mutagenizado que posteriormente será secuenciado y comparado con una base de datos pública para

determinar su función.

Para identificar el sitio de inserción del transposón mini-Tn5 se emplearon oligonucleótidos capaces de leer la secuencia borde del mini-Tn5, lo cual garantiza que el resto de la secuencia amplificada sea adyacente al transposón y corresponda a un fragmento del gen de interés (Duque *et al.*, 2007).

El procedimiento consistió de dos rondas de PCR, en la primera, se incluyó un oligonucleótido específico para el reconocimiento de una secuencia adyacente a la secuencia de inserción "O" en la región terminal del mini-Tn5 y dos oligonucleótidos arbitrarios que amplifican desde cualquier parte al azar del genoma. El producto de la primera amplificación, se utilizó como ADN molde para realizar una segunda ronda de PCR, esta vez con oligonucleótidos específicos que enriquecen la región que comprende la secuencia del transposón.

Se utilizaron las siguientes secuencias de oligonucleótidos y condiciones de PCR de acuerdo a Bernal, 2010 (com. pers):

ARB1A: CCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNNGATAT

ARB2A: CCACGCGTCGACTAGTAC

TNEXT2: CTTTATTGATTCCATTTTACACT

TNINT: GACCTGCAGGCATGCAAGCTTCGGC

CEKG2B: GGCCACGCGTCGGACTAGTACNNNNNNNNNNNACGCC

1a Ronda

DNA molde	1 µl	95 °C - 5'	
dNTPs (10 mM)	5 µl	95 °C - 1'	
Oligo TNEXT 2 (20 µM)	6 µl	40 °C - 1'	6 ciclos
Oligo ARB1A (20 µM)	3 µl	72 °C - 1'	
Oligo CEGK2B (20 µM)	3 µl	95 °C - 30"	
Buffer	5 µl	53 °C - 30"	30 ciclos
MgCl ₂	4 µl	72 °C - 1'	
Taq polimerasa	0.25 µl	72 °C - 7'	
H ₂ O miliQ	hasta 50 µl	14 °C - ∞	

2a Ronda

DNA molde (Amplificado 1a ronda)	5 µl	95 °C - 5'	
dNTPs (10 mM)	5 µl	95 °C - 30"	
Oligo TNINT (20 µM)	3 µl	60 °C - 30"	25 ciclos
Oligo ARB2A (20 µM)	3 µl	72 °C - 1'	
Buffer	5 µl	72 °C - 7'	
MgCl ₂	4 µl	14 °C - ∞	
Taq polimerasa	0.25 µl		
H ₂ O miliQ	hasta 50 µl		

Se obtuvieron productos entre 250 y 500 pares de bases aproximadamente, los cuales se identificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% a 120 V por 45 min.

Posteriormente, se realizó el corte de las bandas más abundantes con un bisturí, las cuales se purificaron con el kit Wizard[®] sv Gel and PCR Clean-Up System.

VI.7 Secuenciación e identificación de la función de genes

Para secuenciar cada banda obtenida en el análisis por PCRs arbitrarias, se realizó una mezcla con 15 µl de la banda cortada y previamente purificada y 1 µl del oligonucleótido TNINT. Las muestras se enviaron a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Chromas Lite 2.1.1 y se realizó un alineamiento de dichas secuencias mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), un programa que compara la secuencia problema con todas las secuencias que se encuentran en la base de datos pública del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Se utilizó la modalidad blastx mediante la cual se realiza una búsqueda de similitud en la base de datos de proteínas a partir de una secuencia de nucleótidos traducida.

VI.8 Identificación de genes

Una vez identificada la función de los fragmentos de genes obtenidos de las mutantes de *K. variicola* T29A2 que mostraron haber perdido la habilidad de proteger a *P. putida* KT2440 de la desecación, se eligió la secuencia del fragmento que obtuvo mayor porcentaje de identidad durante el alineamiento para realizar la amplificación del gen completo, o en su defecto un fragmento de mayor tamaño, mediante oligonucleótidos diseñados a partir del genoma de *K. variicola* At-22, al ser el único genoma de la especie que ha sido completamente secuenciado y que se encuentra disponible en la base de datos pública.

Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:

SAT_KvarA: AAAAGAGAAAATAACTGGCA

SAT_KvarB: AATGTTCAACAGGCGCGAATA

VI.9 Análisis de genomas

Por otro lado, se realizó una búsqueda de transportadores de glutatión en los géneros *Klebsiella* y *Pseudomonas* con el programa MIBlast, una herramienta bioinformática de búsqueda masiva por BLAST, a través de la cual se realizaron alineamientos locales con múltiples secuencias codificantes para diversas proteínas estructurales de transportadores de glutatión reportadas en otras especies y elegidas con base en la búsqueda bibliográfica.

Se consideraron los valores de bit score más altos y los valores de significancia más bajos (E-value), como criterio para considerar si los genomas analizados cuentan con los transportadores de glutatión buscados (Pedraza-Pérez, 2014).

VII. Resultados

VII.1. Experimentos de cointeracción y desecación

Como etapa preliminar, se monitoreó la supervivencia a la desecación de *P. putida* KT2440 y *K. variicola* T29A2 cuando se someten al estrés por sí solas. Los resultados mostraron que *P. putida* KT2440 pierde por completo la viabilidad después de la desecación, ya que no se encontraron unidades formadoras de colonias a los 18 días de haberse sometido al estrés. Por otro lado, *K. variicola* T29A2, mantuvo una tasa de supervivencia elevada y se estimó un valor de BSR = 75.3 a los 18 días de desecación (Fig. 4).

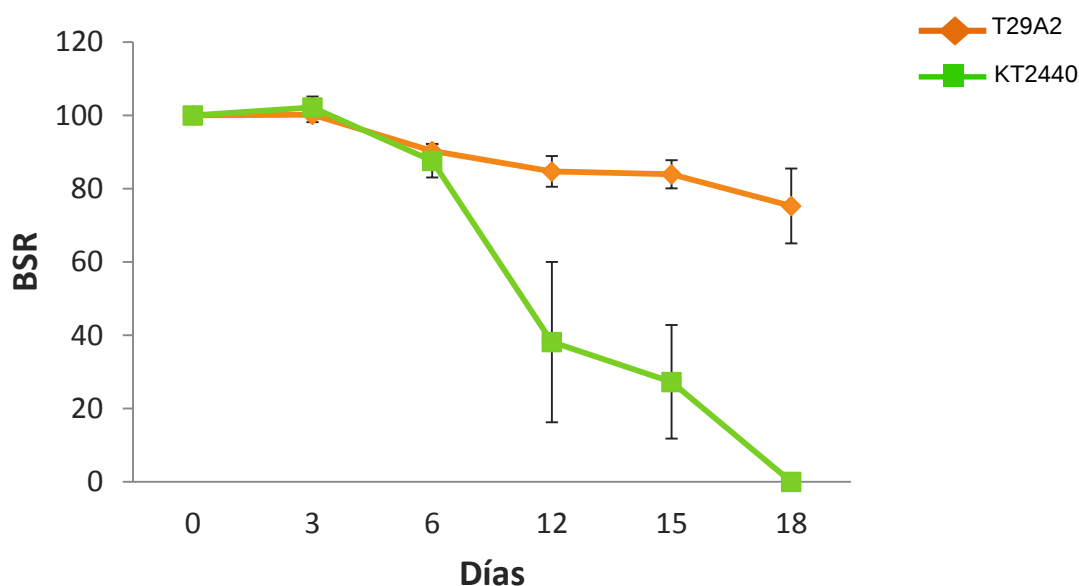


Figura 4. Supervivencia a la desecación de *P. putida* KT2440 y *K. variicola* T29A2 sometidas al estrés sin interactuar. Cada punto del gráfico representa el promedio de 5 réplicas con su respectiva desviación estándar.

VII.1.1 Cointeracción durante el estrés

Una vez registrada la supervivencia de ambas cepas sometidas a desecación por separado. Se evaluó la supervivencia de las dos bacterias cuando interactuaron únicamente en el momento en el que se enfrentaron al estrés. Se observó que la supervivencia de *P. putida* KT2440 descendió notablemente desde el sexto día de desecación hasta no encontrar células viables después de 18 días, no obstante, *K. variicola* T29A2 mostró una tasa de

supervivencia bacteriana de 77.02 al final del estrés (Fig. 5).

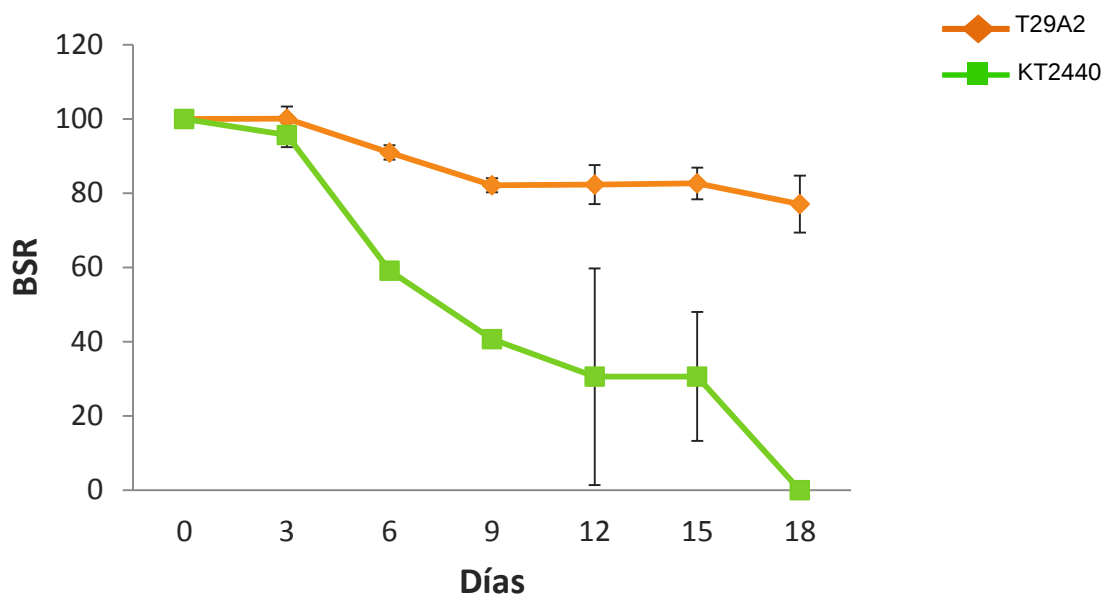


Figura 5. Supervivencia a la desecación de *P. putida* KT2440 y *K. variicola* T29A2 cuando co-interaccionan durante el estrés. Análisis de cinco réplicas por cada tiempo y su respectiva desviación estándar.

VII.1.2 Cointeracción antes del estrés

Por otro lado, se observó una mejora en la supervivencia de *P. putida* KT2440 cuando co-interacciona con *K. variicola* T29A2 antes de ser sometida al estrés, ya que a diferencia de cuando se somete al estrés sola o en cointeracción con *K. variicola* T29A2 únicamente durante el estrés, se mantiene viable aún después de los 18 días de desecación, mostrando una tasa de supervivencia de 39.21, mientras que, *K. variicola* T29A2 mantiene una BSR de 89.60 (Fig. 6).

De acuerdo al análisis estadístico, se encontró que el incremento en la supervivencia de *P. putida* KT2440 es significativo ($p < 0.001$) respecto a su supervivencia cuando es sometida al estrés por sí sola.

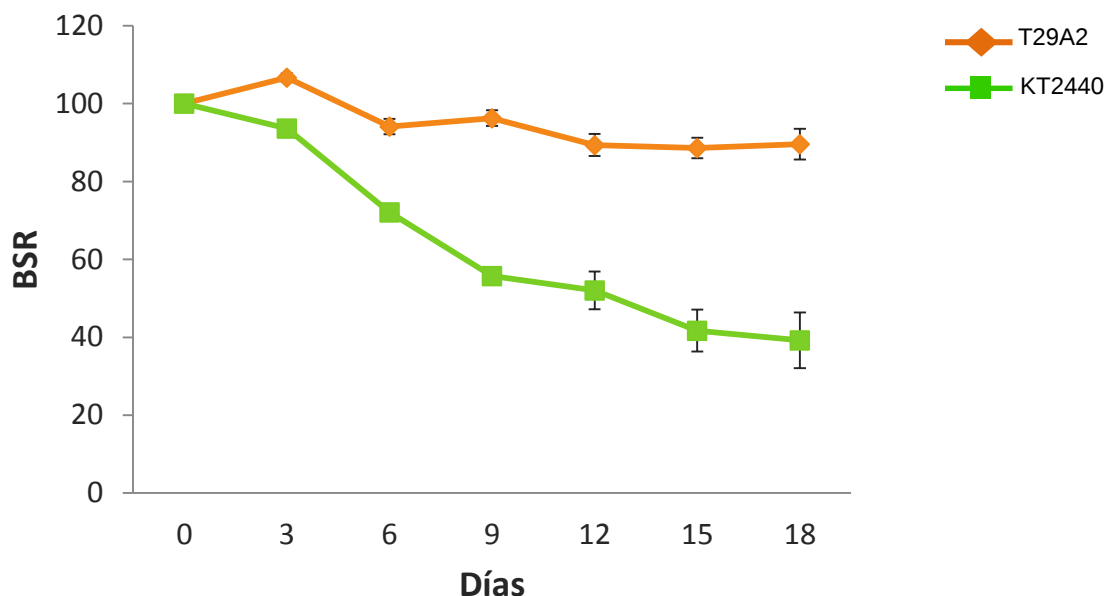


Figura 6. Supervivencia a la desecación de *P. putida* KT2440 y *K. variicola* T29A2 cuando co-interaccionan 24 horas antes de someterse al estrés. Análisis de cinco réplicas y su respectiva desviación estándar.

VII.1.3 Cointeracción con mutantes de *K. variicola* T29A2

En vista de que la cepa silvestre de *K. variicola* T29A2 mostró un efecto protector hacia *P. putida* KT2440 para enfrentar el estrés por desecación, cuando crecen juntas durante 24 horas antes de someterse al estrés, se realizaron experimentos de cointeracción de la misma forma entre *P. putida* KT2440 y mutantes de *K. variicola* T29A2, con la finalidad de encontrar aquellas mutantes que han perdido la habilidad de proteger a *P. putida* de la desecación.

A través del método rápido, se sometieron a desecación 620 mutantes de *K. variicola* cointeractuando con *P. putida* KT2440 y se identificaron cuatro mutantes en genes implicados en la protección de *P. putida* KT2440 contra el estrés, dado que no se observaron unidades formadoras de colonias después de 5 días de desecación (Fig.7).

Para corroborar que las cuatro mutantes encontradas a través de la metodología rápida en efecto estaban mutadas en los genes de interés, se repitieron los experimentos de desecación estándar durante 18 días entre cada una de las mutantes seleccionadas con el método rápido y *P. putida* KT2440.

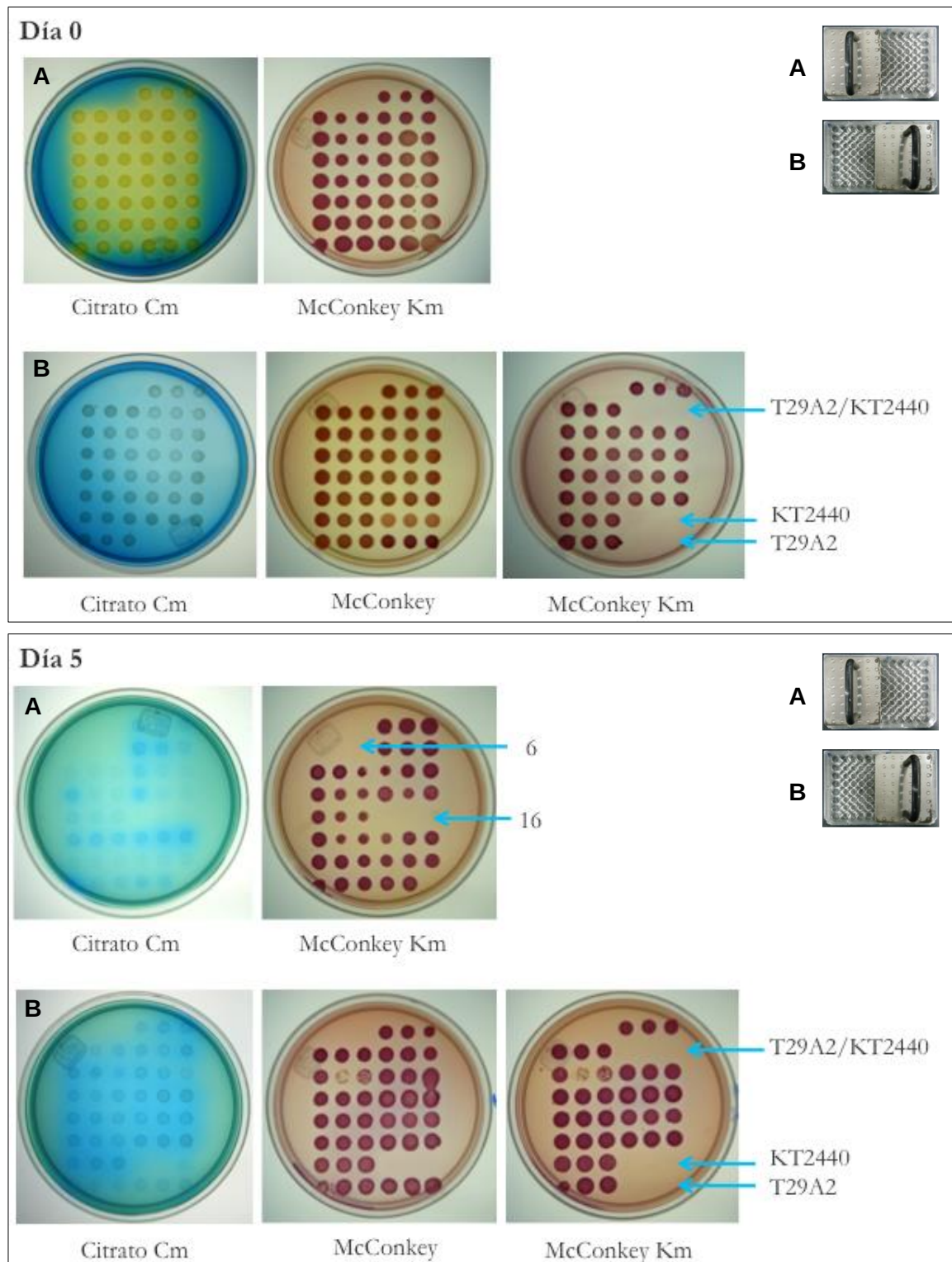


Figura 7. Identificación de mutantes que dejan de proteger a *P. putida* KT2440 de la desecación mediante el método rápido. Antes de la desecación (arriba). Después de 5 días de desecación (abajo). Las mutantes se identifican con números, mientras que, los controles se refieren a *P. putida* KT2440 en cointeracción con la cepa silvestre de *K. variicola* T29A2, así como *P. putida* y *K. variicola* silvestre sin interactuar.

El monitoreo de la supervivencia durante los 18 días de desecación mostró que la co-interacción con ninguna de las mutantes seleccionadas mejoró la supervivencia de *P. putida* al estrés (Fig. 8, 9, 10, 11). Asimismo, se encontraron dos mutantes sensibles a la desecación, ya que al igual que *P. putida*, tampoco sobrevivieron al estrés (Fig. 8 y 9), no obstante, otras dos mutantes mostraron claramente estar afectadas en genes involucrados específicamente en la protección de *P. putida* KT2440, ya que no la protegieron del estrés pese a ser altamente resistentes (Fig. 10 y 11).

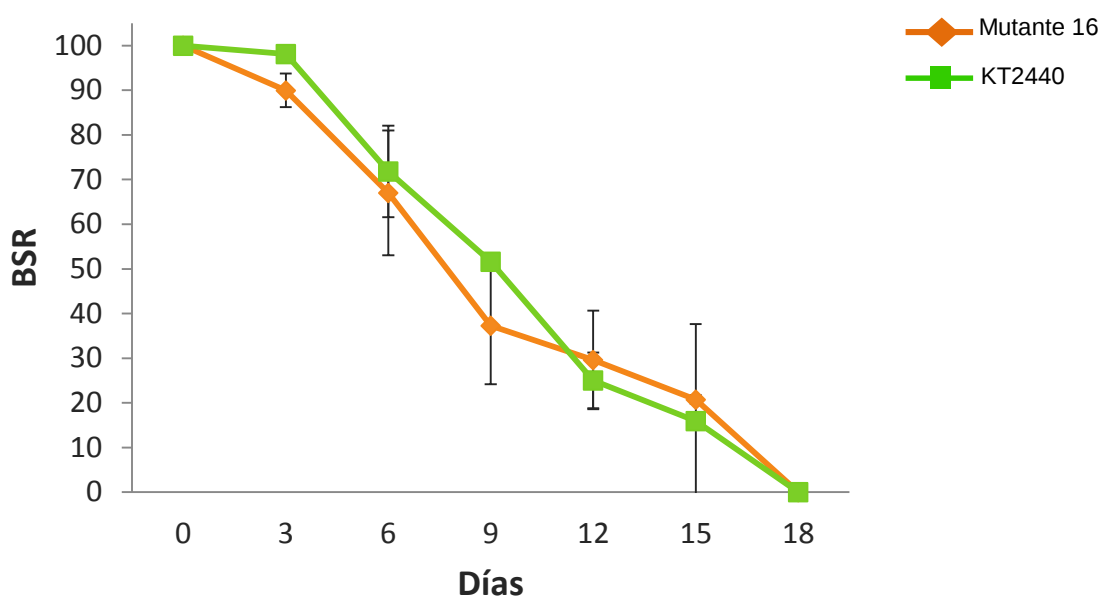


Figura 8. Supervivencia a la desecación de *P. putida* KT2440 en cointeracción con la mutante 16. Análisis de cinco réplicas y su respectiva desviación estándar.

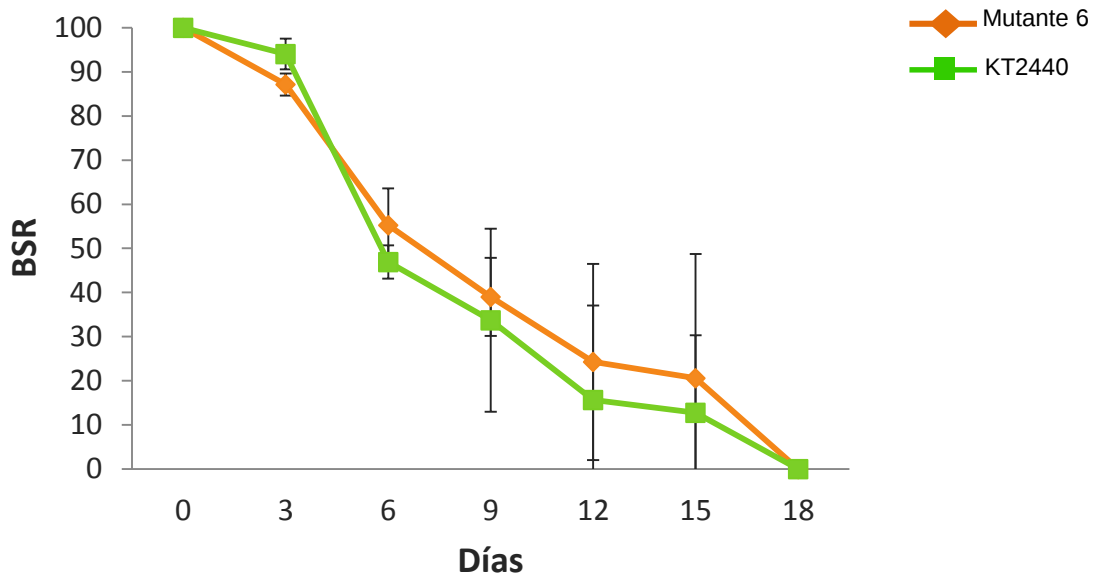


Figura 9. Supervivencia a la desecación de *P. putida* KT2440 en cointeracción con la mutante 6. Análisis de cinco réplicas y su respectiva desviación estándar.

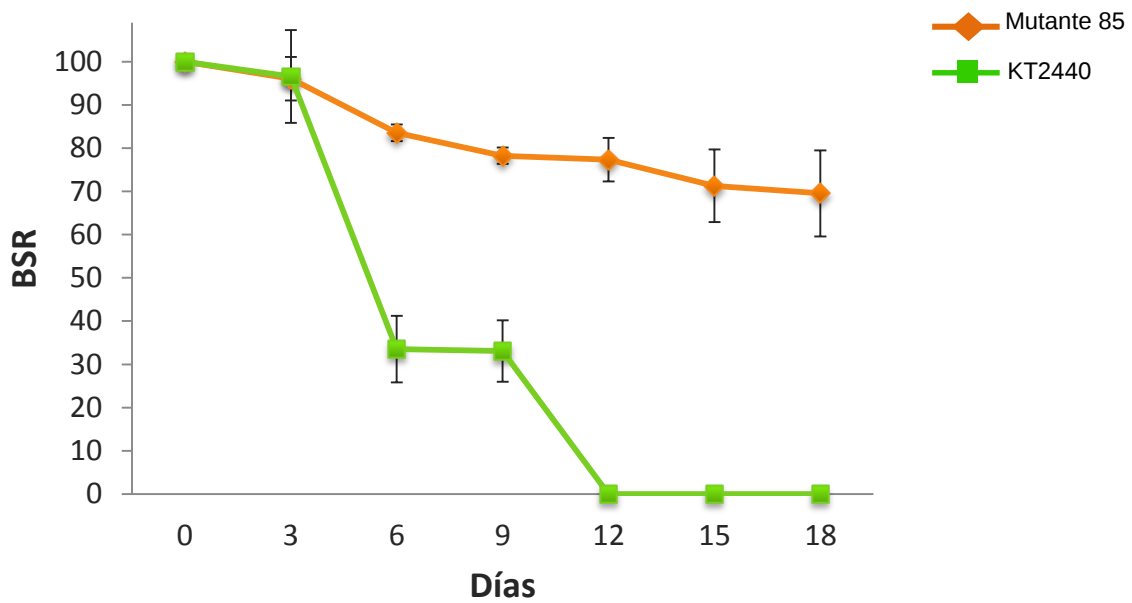


Figura 10. Supervivencia a la desecación de *P. putida* KT2440 en cointeracción con la mutante 85. Análisis de cinco réplicas y su respectiva desviación estándar.

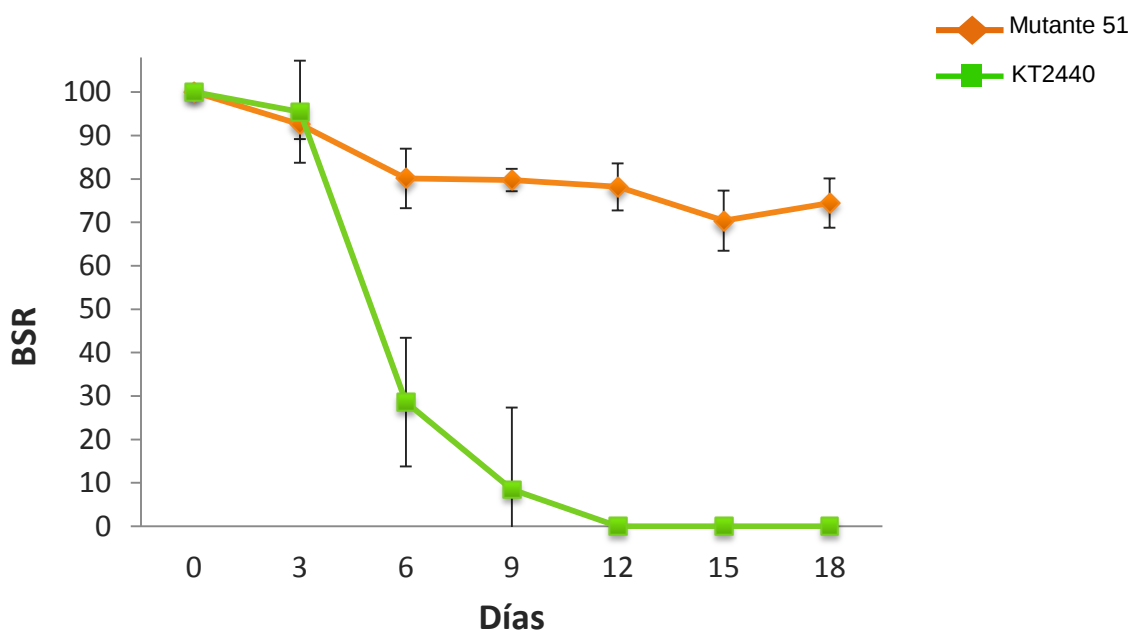


Figura 11. Supervivencia a la desecación de *P. putida* KT2440 en cointeracción con la mutante 51. Análisis de cinco réplicas y su respectiva desviación estándar.

VII.2 Comprobación de la inserción del transposón mini-Tn5 en mutantes de *K. variicola* T29A2

Para corroborar la inserción del transposón mini-Tn5 con el que fue realizada la banca de mutantes, se realizó la amplificación del marcador de resistencia a kanamicina en las mutantes de interés, y posteriormente se realizó la identificación de los genes mutagenizados a través de la metodología de PCRs arbitrarias.

Se amplificó un fragmento de aproximadamente 428 pares de bases en todas las mutantes de interés, igual al tamaño esperado del gen de resistencia a kanamicina (Fig. 12).

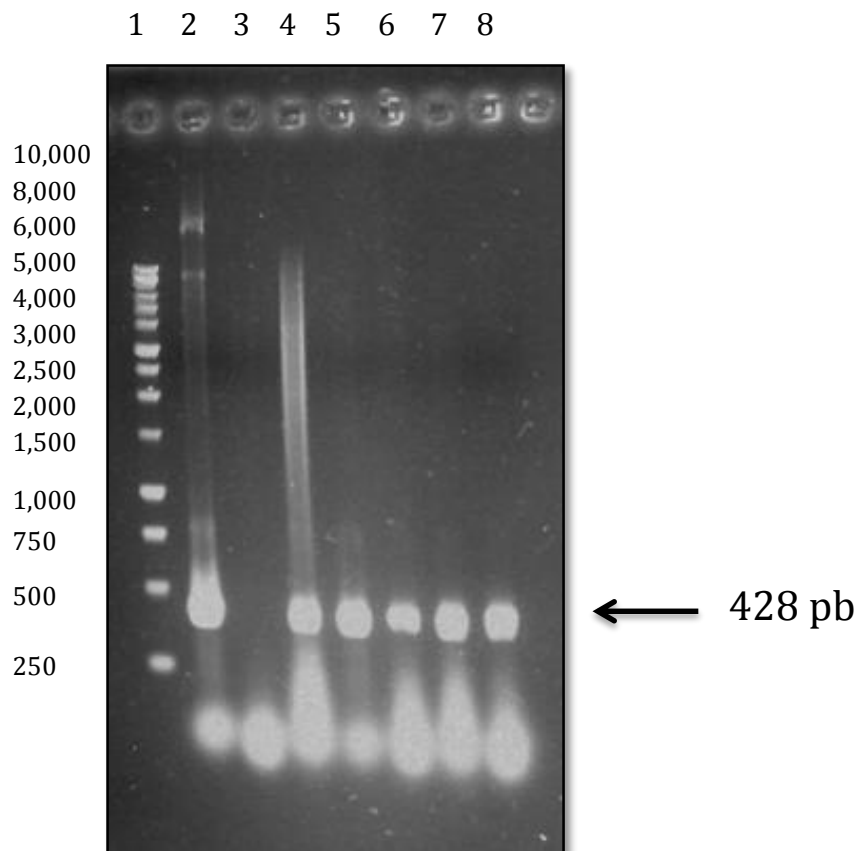


Figura 12. Productos de amplificación del gen de resistencia a kanamicina. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Carril 1: Marcador molecular. Carril 2: *E. coli* cc118 (control positivo). Carril 3: *K. variicola* T29A2 silvestre (control negativo). Carril 4: *mutante 16*. Carril 5: *mutante 6*. Carril 6: *mutante 85*. Carril 7: *mutante 51*. Carril 8: *mutante tomada al azar de la banca*.

VII.3 PCRs arbitrarias

La identificación de mutantes con las cuales *P. putida* no sobrevive a la desecación, sugiere la existencia de algunos genes implicados en la protección de la bacteria sensible durante el estrés, para caracterizar tales genes, se realizó primero la amplificación de un fragmento de dichos genes mediante PCRs arbitrarias, tomando como referencia la secuencia conocida del transposón mini-Tn5.

Se obtuvieron bandas de distintos tamaños durante la amplificación del ADN de cada mutante, no obstante, las bandas más abundantes se observaron entre 300 y 600 pares de bases (Fig. 13). La banda más abundante de cada mutante se cortó y purificó, y posteriormente se envió a secuenciar.

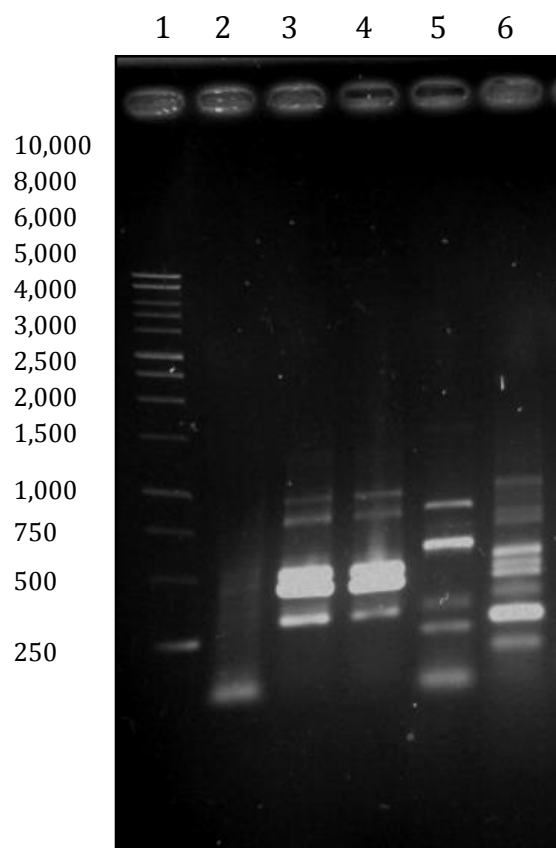


Figura 13. Productos de amplificación mediante PCRs arbitrarias. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Carril 1: Marcador molecular. Carril 2: *K. variicola* T29A2 silvestre (control negativo). Carril 3: *mutante 6*. Carril 4: *mutante 16*. Carril 5: *mutante 85*. Carril 6: *mutante 51*.

VII.4 Secuenciación e identificación de la función de genes

Se obtuvieron secuencias entre 500 y 750 pares de bases, lo cual corresponde al tamaño de las bandas amplificadas mediante las PCRs arbitrarias. En cada secuencia, se identificó la región terminal “O” del transposón mini-Tn5, lo que corrobora que la PCR arbitraria fue efectiva y que la secuencia adyacente corresponde a un fragmento del gen en el que se insertó el transposón.

La comparación de las secuencias obtenidas con las bases de datos del banco de genes (NCBI), mostró que algunos genes involucrados en la protección de *P. putida* contra la desecación codifican para proteínas hipotéticas que aún no han sido bien descritas en la base de datos comparada, sin embargo, con base en el análisis de dominios conservados, se determinó que tales genes corresponden a dos reguladores transcripcionales de respuesta a elementos xenobióticos, una proteína hipotética codificada en un plásmido de

virulencia de *K. pneumoniae* y una enzima serina-O-acetil-transferasa involucrada en la síntesis de L-cisteína.

Las secuencias de las mutantes 6 y 16 mostraron 83% de identidad con proteínas hipotéticas de *K. pneumoniae*, el análisis mostró una región similar al dominio BetR correspondiente a una superfamilia de proteínas de unión a ADN que pertenecen a la familia de reguladores transcripcionales en respuesta a elementos xenobióticos (Fig. 14).

Por otro lado, se observó un 85% de identidad entre la secuencia de la mutante 85 y una proteína hipotética descrita en general para varios microorganismos de la familia Enterobacteriaceae. La proteína ha sido denominada hasta ahora “KPN” debido a que se encuentra en el plásmido pKPN4 de *K. pneumoniae* MGH 78578. El plásmido se encuentra completamente secuenciado y la proteína en cuestión se observó ubicada entre los genes *traB* y *traC* (Fig.15).

Finalmente, la secuencia de la mutante 51, mostró un 100% de identidad con una región de la proteína serina-o-acetil-transferasa, donde 52 aminoácidos correspondieron al dominio conservado LbH_SAT, el cual cataliza la acetilación con la coenzima A de la L-serina para formar O-acetilserina, como primer paso para la formación de L-cisteína de acuerdo al análisis en la base de datos de dominios conservados (Fig. 16).

A

Hypothetical protein [*Klebsiella pneumoniae*]

GGGGCGCCAKGGCGCGGCGC**CTTGTGTATAAGAGTCAG***CCTAAAGACTTAGCGACTTTTCCAGCTGTG
AGTTTTCCAGGACGCAAAACCTTTTCATTTTACGGTTTTCGGTGGGTGATGGTTATACCGAGTACATTAGCTAT
ATGAGTAGTATGTTTGTCTTTGAAATACCCCTTTTCATTTCRTGATGTTGCTTAACKTCTCACTAATCTTAAGTT
CAATTGGTGTCSATTTMGCTGTCCTCATATCGGCCTTCTGTAGGGTGGGTAATGACATWTTAGGTTGTTA
CTGTAGGKACAGTGACCTTAACTCCCCTCCACCMRGGAGMG

B

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
hypothetical protein [<i>Klebsiella pneumoniae</i>]	107	107	57%	6e-26	83%	WP_023317827.1
BetR domain protein [<i>Klebsiella pneumoniae</i>]	106	106	57%	3e-25	81%	WP_020802755.1
BetR domain protein [<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> KPNH27]	106	106	57%	3e-25	81%	AIA45467.1
response regulator receiver protein [<i>Serratia marcescens</i> SM39]	44.3	44.3	43%	0.004	42%	BAO37004.1
chemotaxis protein CheY [<i>Burkholderia cenocepacia</i>]	44.3	44.3	52%	0.006	35%	WP_006479895.1

C

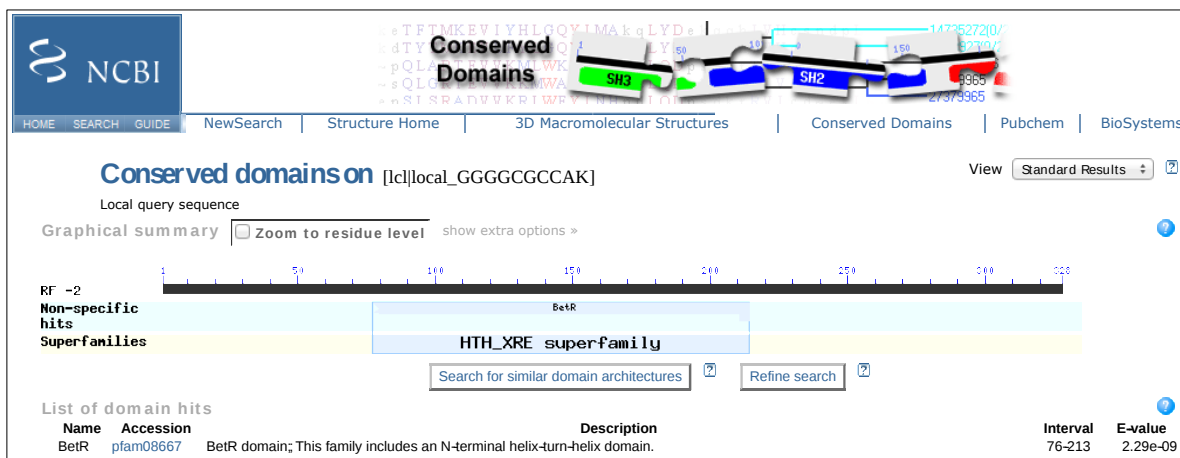


Figura 14. A) Secuencia obtenida de la banda amplificada a partir del ADN de la mutante 6. *Secuencia correspondiente a la región “O” del mini-Tn5. B) Resultados del análisis de alineamiento de acuerdo al porcentaje de identidad. C) Análisis de dominios conservados en la secuencia.

A

Hypothetical protein KPN_pKPN4p07135 [*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* MGH 78578]

GACGCAKGC GCGGCGCM **TTGTGTATAAGAGTCAG***ACCTTCCCCCATCCGCCAAAAGGAATAAATCAAGA
 AAAATAAAAAATAAAAAACCACTGTTGCAGTAGACCCTCCCGTTATTATAGCCATAATCAAATCAGGAGAGC
 CGCTCCACATACTTTTATCCATAAACACAACGAAAGAAAAGAAAGCACTGAGCCCAACAAGACCCAGTAAC
 ATTTAAATATGAGTAAGGGTATCCTTTACAAAAATGCTCATAACTATATACCCGTAACCACAGGCAATAATTG
 CCATTGCAAAAAATAGTCGTACAAAACCATCAAACTTAAGTGGTATTACGCCATTTACCCACCTCACTCAAT
 GTTCTATCACGCTGTTCAAAGGCTCGCGGGTTTAAATTTCAATGCACTCTCCTGTATTACTTCCATAACCTC
 TTCCTCCACGTGCTTCGAGTACCCGTAGCATTTTTATGCAAAACATCTGTATTAGGCATGGGAGAAACATTCC
 AAATCCCACCACCACTACTCGGCGTCCYWCYYMSMGTA TAGTCGACGCGTGGMCRRA

B

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
MULTISPECIES: hypothetical protein [Enterobacteriaceae]	152	152	54%	7e-44	85%	WP_004152502.1
membrane protein [Klebsiella pneumoniae]	151	151	54%	1e-43	72%	WP_032740692.1
MULTISPECIES: hypothetical protein [Klebsiella]	150	150	54%	3e-43	72%	WP_023316403.1
hypothetical protein [Klebsiella pneumoniae]	149	149	54%	2e-42	71%	WP_015632502.1
membrane protein [Klebsiella pneumoniae]	148	148	53%	3e-42	70%	WP_032442651.1

C

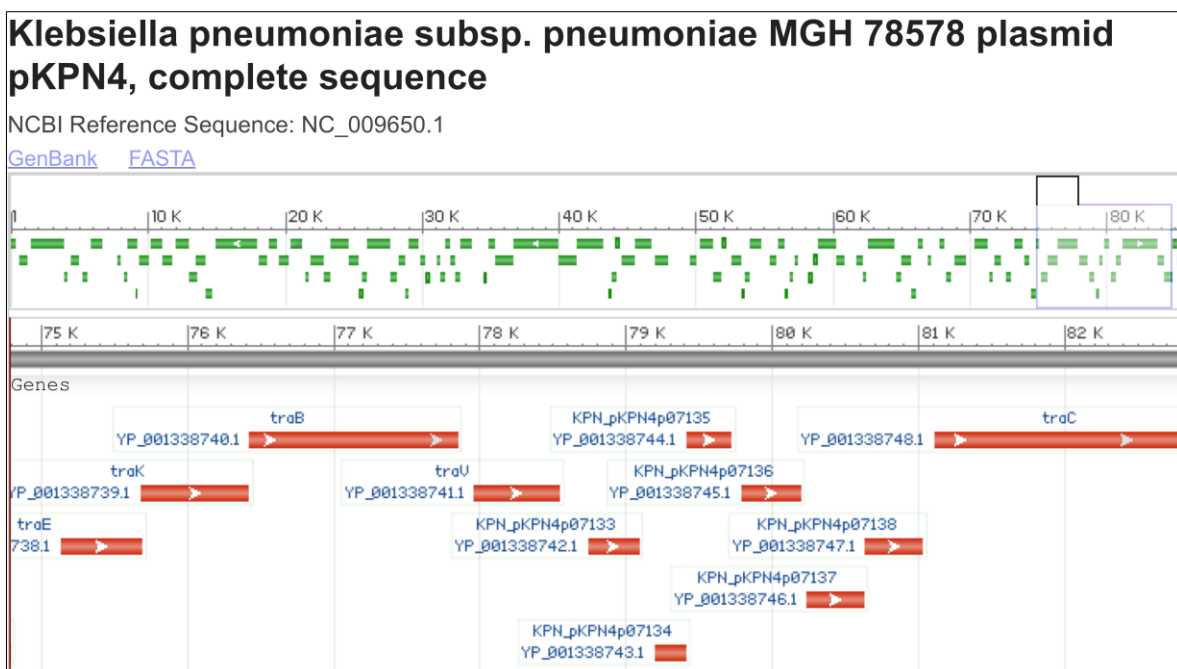


Figura 15. A) Secuencia obtenida de la banda amplificada a partir del ADN de la mutante 85. *Secuencia correspondiente a la región “O” del mini-Tn5. B) Resultados del análisis de alineamiento de acuerdo al porcentaje de identidad. C) Ubicación de la proteína KPN_pKPN4p07135 en el plásmido pKPN4.

A

Serine acetyltransferase [*Klebsiella variicola* At-22]

CCWGC GCGGCGC **ACTTGTGTATAAGAGTCAG***GTGATGCACTATCGGCTGGCCCATGAGCTGCATCAGC
TCGACCTTCCGCTGCTGGCGCGCATCATCACGGAAAAGGCGCATAGCCAGACCGGAATCGATATTCATCC
CGGTGCGCAGATTGATGACGGATTCTTTATCGATCACGGAACCGGCGTSCCYYYYYYYYGTACTAGTCGAC
GCGTGGA

B

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
MULTISPECIES: serine acetyltransferase [<i>Klebsiella</i>]	110	110	72%	3e-27	100%	WP_008804177.1
serine acetyltransferase [<i>Klebsiella pneumoniae</i>]	110	110	72%	3e-27	100%	WP_032733503.1
MULTISPECIES: serine acetyltransferase [<i>Klebsiella</i>]	110	110	72%	3e-27	100%	WP_012967641.1
serine acetyltransferase [<i>Klebsiella oxytoca</i>]	104	104	72%	2e-25	94%	WP_025107020.1
serine acetyltransferase [<i>Klebsiella oxytoca</i>]	104	104	72%	3e-25	94%	WP_014229051.1

C

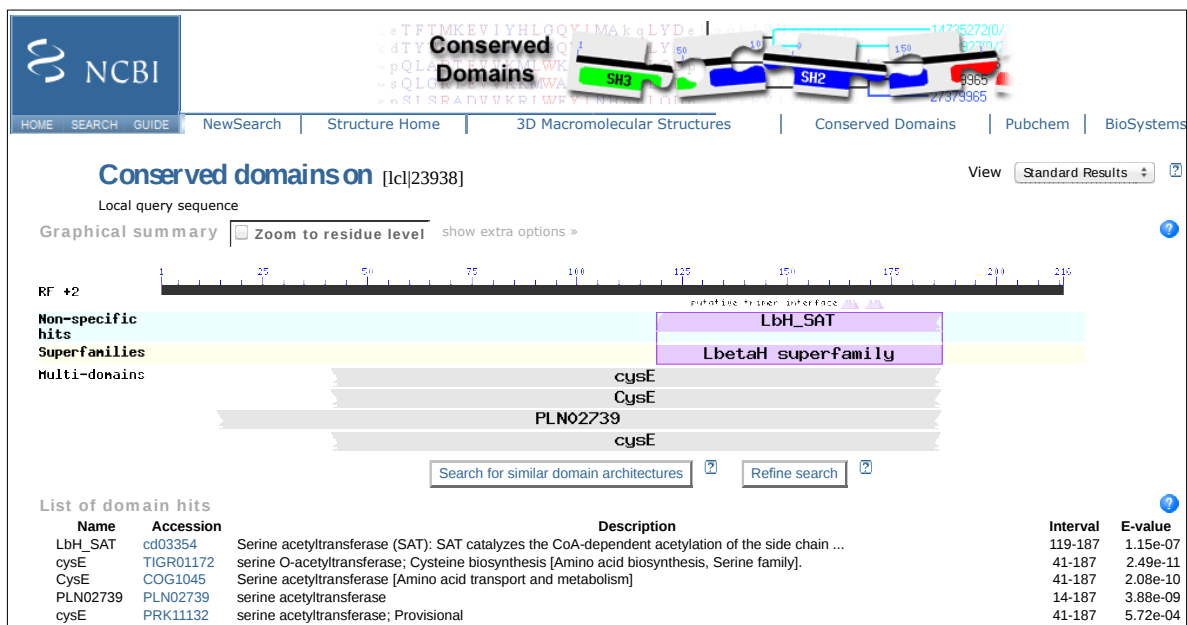


Figura 16. A) Secuencia obtenida de la banda amplificada a partir del ADN de la mutante 51. *Secuencia correspondiente a la región “O” del mini-Tn5. B) Resultados del análisis de alineamiento de acuerdo al porcentaje de identidad. C) Análisis de dominios conservados en la secuencia.

VII.5 Identificación de genes

Al tener el 100% de identidad, se eligió el fragmento del gen obtenido por PCRs arbitrarias de la mutante 51 para demostrar la identidad de este gen aparentemente involucrado en la protección de *P. putida* KT2440 contra la desecación, así como para amplificar la mayor fracción posible del gen completo. Para ello se diseñaron oligonucleótidos que amplificaran desde el principio hasta el final del gen, con base en la secuencia del gen *sat* (serin-O-acetil-transferasa) de *K. variicola* At-22 al ser la cepa con la que se encontró mayor similitud en el análisis anterior (Fig. 17).

```
ATGCCGGAAGCGGGTGAATTGTATCTCTTGCCGAAAAGAGAAAATAACTGGCAATTTAAATAATGTCTGTCATGAATTGCGTCGCGTTTCGCCAGGCGTGGCGCGATGAGCACGCGAAGAATAATTATCGTAATAAACGGAGTTTACCTTCCCGGGAAGCGTTAATTCCGTCGCGGATACATTGATAAAAGTGCTTTATCCGATGCGCTTAGGCGACGTGGACTTACGCAAAGAGGGGGAAGATTATTACGTCGGCCATTTGCTGGGCACCGCGCTGGACAGCTCACCGAAGAAGCACTTCTGGAACCTATTATCAGTCGGATGAGCAGGCGGAAAATGAGGTCCTGTTGCGGAGGCGGTCAGACGCGTTCAGCAGTTTGCCAACCGTTTACCGGTGATTGTCAGCGCTTGACGGTGATATCCTCGCCGCTTATCAGGGTGACCCCTCCGCGCGCAGCATGGATGATGTGCTGCTCTGCTACCCGGGAATTCATGCGG*TGATGCACTATCGGCTGGCCCATGAGCTGCATCAGCTCGACCTTCCGCTGCTGGCGCGCATCATCAGGAAAAGGCGCATAGCCAGACCGGAATCGATATTCATCCCGGTGCTCAGATTGATGACGGATTCTTTATCGATCACGGAACCGGCGT*GGTCATTGGTGAAACCGCCATCGTCGGTAAACGAGTACGTATTTATCAAGCCGTCAACCCTGGGGGCCAAACGTTTCCTCGTCGGTGAGGACGGACAATTGCAAAAAAATTATCCTGCCACCCTATTATTGAAGATGACGTTGTGATTTATGCCGGCGCGACAATCCTCGGGAGAATTACCATTGGCGCGCGCTCCAGCATCGGAGGAAATATCTGGCTAACCCGTGATGTGCCACCGGACAGTAATGTTCAACAGCGCGAATACAGCAGAGACATTCAGCGACGGCGACGGCATTAA
```

Figura 17. A) Diseño de oligonucleótidos con base en la secuencia del gen *sat*. Secuencias de los oligos SAT_KvarA al inicio y SAT_KvarB al final del gen (en rojo). Secuencia obtenida mediante PCRs arbitrarias (en negro).

En primer lugar se realizó una PCR con los dos oligonucleótidos diseñados, esperando encontrar que en la mutante 51 se observara una banda de mayor tamaño que en otras mutantes y en la silvestre al tener insertado el transposón mini-Tn5. De acuerdo a los resultados, se encontraron distintas bandas en cada mutante analizada, sin embargo, se amplificó una banda de más de 1,200 pares de bases en la mutante 51, mientras que, en la cepa silvestre y otras mutantes se observó una banda de aproximadamente 950 pares de bases correspondiente al tamaño del gen *sat* (Fig. 18).

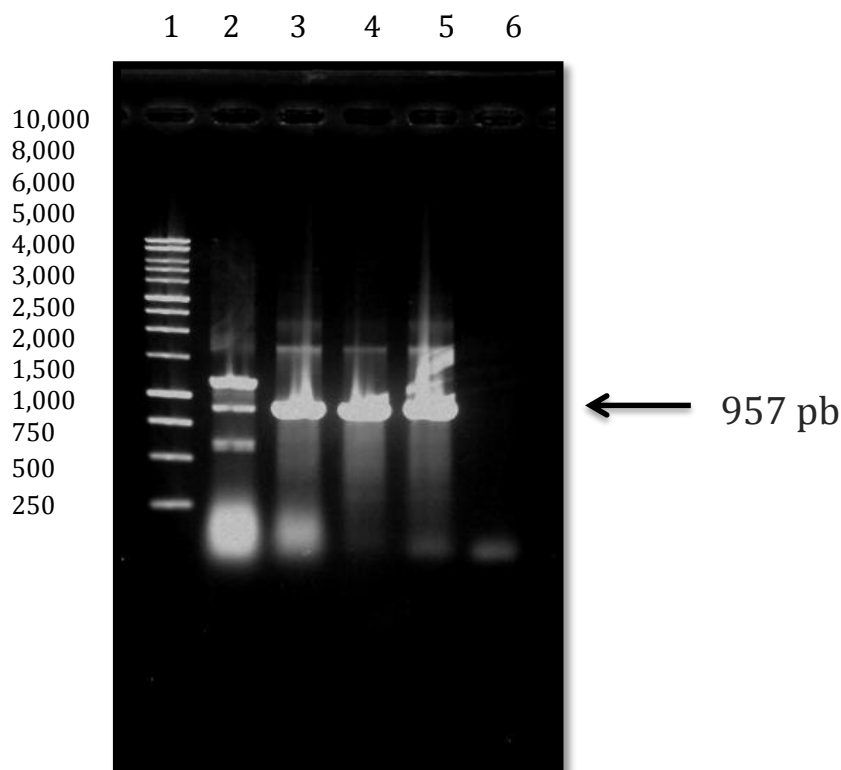


Figura 18. Productos de amplificación del gen *sat*. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Carril 1: Marcador molecular. Carril 2: *mutante 51*. Carril 3: *mutante aleatoria*. Carril 4: *mutante 6*. Carril 5: *K. variicola* T29A2 silvestre. Carril 6: *P. putida* KT2440 (control negativo).

Por otro lado, se realizó una PCR confirmatoria con el oligo TNINT y los dos oligos anteriores, para corroborar que la *mutante 51* está mutada en el gen *sat*, así como para obtener más información sobre la posición del transposón dentro del gen. La prueba fue positiva únicamente con el oligo TNINT y el oligo SAT_KvarB en la *mutante 51*, lo cual además de confirmar la transposición del mini-Tn5 en el gen *sat*, sugiere que la inserción del transposón ocurrió en dirección 5' -> 3' (Fig. 19).

Cabe señalar que se observó un par de bandas muy tenues en la *mutante aleatoria* que se utilizó con fines de comparación, no obstante, tales bandas no corresponden al tamaño del amplificado de interés y después de haberlas secuenciado y comparado con la base de datos pública, no se encontró similitud con ninguna secuencia del banco de genes, con lo que se considera que se trató de amplificadores inespecíficos; contrario a la banda amplificada en la *mutante 51*, cuya secuencia también fue comparada y correspondió a la serina-O-acetil-transferasa de *K. pneumoniae* y *K. variicola* At-22 (Fig. 20).

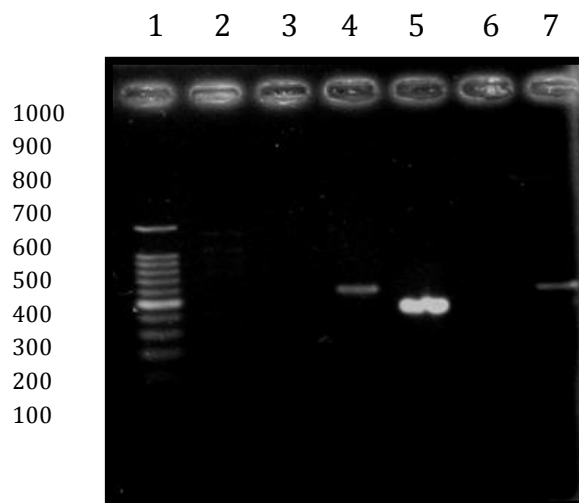


Figura 19. Producto de amplificación del gen *sat* en la mutante de interés. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Carril 1: Marcador molecular. Carril 2 – 4: Amplificación con oligos TNINT y SAT_KvarA. Carril 5 – 7: Amplificación con oligos TNINT y SAT_KvarB. Carril 2: *mutante 51*. Carril 3: *K. variicola* T29A2 silvestre. Carril 4: *mutante aleatoria*. Carril 5: *mutante 51*. Carril 6: *K. variicola* T29A2 silvestre. Carril 7: *mutante aleatoria*.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
serine acetyltransferase [Klebsiella pneumoniae]	199	199	99%	3e-61	100%	WP_032733503.1
MULTISPECIES: serine acetyltransferase [Klebsiella]	199	199	99%	3e-61	100%	WP_008804177.1
MULTISPECIES: serine acetyltransferase [Klebsiella]	199	199	99%	4e-61	100%	WP_012967641.1
serine acetyltransferase [Klebsiella oxytoca]	190	190	99%	1e-57	94%	WP_025107020.1
serine acetyltransferase [Klebsiella oxytoca]	190	190	99%	2e-57	94%	WP_014229051.1
MULTISPECIES: serine acetyltransferase [Klebsiella]						
Sequence ID: ref WP_012967641.1 Length: 318 Number of Matches: 1						
See 1 more title(s)						
serine O-acetyltransferase [Klebsiella variicola At-22]						
Sequence ID: ref YP_003438586.1 Length: 318 Number of Matches:						
Range 1: 168 to 264						
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
199 bits(507)	4e-61()	Compositional matrix adjust.	97/97(100%)	97/97(100%)	0/97(0%)	+1
Features:						
Query 1	VMHYRLAHELHQLDLP LLARIITEKAHSQTGIDIHPGAQIDDDGFFIDHGTGVVIGETAIV					180
Sbjct 168	VMHYRLAHELHQLDLP LLARIITEKAHSQTGIDIHPGAQIDDDGFFIDHGTGVVIGETAIV					227
Query 181	GKRVRIYQAVTLGAKRFLVGEDGQLQKNYPRHPIED					291
Sbjct 228	GKRVRIYQAVTLGAKRFLVGEDGQLQKNYPRHPIED					264

Figura 20. Resultados confirmatorios de la secuencia amplificada con los oligos TNINT y SAT_KvarB en la mutante 51.

VII.6 Análisis de genomas

Antes de atribuir la habilidad de protección al gen *sat* de *K. variicola* T29A2, se realizó una búsqueda de genes codificantes para serina-O-acetiltransferasas en el genoma de *P. putida* KT2440.

Los resultados mostraron que también *P. putida* KT2440 tiene genes codificantes para esta enzima denominados *cys*; de acuerdo a la información disponible, tanto *Cys* como *Sat*, tienen la misma función, ambas participan en la primera etapa de la formación de L-cisteína en la célula, no obstante, se encontró que las secuencias no son homólogas ya que no comparten similitud en sus secuencias nucleotídicas.

Con la finalidad de conocer qué proteínas podrían estar formadas por cisteína para responder al estrés por desecación, se realizó una búsqueda bibliográfica de las principales moléculas protectoras frente a diversas condiciones de estrés relacionadas con el gen *sat* y la producción de cisteína.

Con base en la información obtenida, se encontró que la cisteína forma parte estructural de algunos antioxidantes, e incluso, el sitio activo de tales antioxidantes, corresponde a una cisteína cuyo grupo sulfhidrilo reacciona con las ROS acumuladas en el citoplasma de la célula como consecuencia del estrés. Gran parte de la literatura menciona al glutatión como el principal antioxidante que gracias a la cisteína en su estructura ejerce un efecto protector contra diferentes tipos de estrés. Debido a que se ha reportado que el glutatión es exportado activamente para regular las concentraciones tóxicas del glutatión en su estado oxidado, se realizó una búsqueda de transportadores de glutatión y cisteína en especies de los géneros *Klebsiella* y *Pseudomonas*.

De acuerdo a la literatura, los transportadores de glutatión mayor documentados, correspondieron a *CydC* y *CydD*, dos proteínas que participan en la exportación de glutatión y cisteína al periplasma en *E. coli*; y las proteínas codificadas por el operón *gsiABCD* de *Shigella* sp. y *E. coli*, que participan en la importación de glutatión desde el medio externo hacia el citoplasma. Tales secuencias fueron utilizadas para realizar la búsqueda de transportadores similares en los géneros *Klebsiella* y *Pseudomonas*.

En las tablas II y III se observan algunos de los resultados más representativos obtenidos de la búsqueda de transportadores de glutatión. Se encontraron valores de similitud significativos (E-value=0.0) con *CydC* y *GsiA* en varias especies del género *Klebsiella*

incluida *K. variicola*, lo cual sugiere que *K. variicola* presenta tanto sistemas de exportación como de importación de glutatión (tabla II). Por otro lado, no se encontraron valores significativos de similitud con CydC y CydD en el género *Pseudomonas*, sin embargo, se encontró que *P. putida* KT2440 cuenta con dos proteínas homólogas a GsiA y GsiC, lo que sugiere que únicamente cuenta con proteínas que participan en la importación de glutatión, no obstante, las proteínas con las que se encontró un grado de similitud significativa, no están descritas como transportadores de glutatión sino como proteínas de unión a ATP que participan en el transporte de opina (Tabla III).

Tabla II. Transportadores de glutatión encontrados en especies del género *Klebsiella*. T=Transportador, E=E-value, BS=Bit Score.

T	E	BS	Especie	Descripción
CydC	0.0	915	<i>Klebsiella_pneumoniae_342_Plasm:p</i> KP187	[cysteine/glutathione_ABC_transp orter]
CydC	0.0	910	<i>Klebsiella_oxytoca_KCTC_1686_Plas</i> m:pKOX_NDM1	[cysteine/glutathione_ABC_transp orter]
CydC	0.0	906	<i>Klebsiella_variicola_At_22_Plasm:pK</i> RH	[cysteine_ABC_transporter_perm ease/ATP-binding]
CydD	5e ⁻⁰⁵	43	<i>Klebsiella_pneumoniae_pneumoniae</i> HS11286_Plasm:pKPHS6	[molybdenum_transport_ATPbind ing_protein]
CydD	2e ⁻⁰⁵	40	<i>Klebsiella_oxytoca_E718_Plasm:pKO</i> X_R1	[macrolide_efflux_protein]
GsiA	0.0	985	<i>Klebsiella_oxytoca_E718_Plasm:pKR</i> AD01	[glutathione_transporter_ATPbind ing_protein]
GsiA	0.0	961	<i>Klebsiella_pneumoniae_KCTC_2242</i> _Plasm:p2	[glutathione_transporter_ATPbind ing_protein]
GsiB	0.0	918	<i>Klebsiella_oxytoca_KCTC_1686_Plas</i> m:pKOX_NDM1	[glutathione_ABC_transporter_su bstrate-binding]
GsiB	0.0	909	<i>Klebsiella_pneumoniae_342_Plasm:p</i> KP187	[glutathione_ABC_transporter_su bstrate-binding]
GsiB	0.0	907	<i>Klebsiella_variicola_At_22_Plasm:pK</i> RH	[family_5_extracellular_solutebind ing_protein]
GsiD	7e ⁻¹⁷⁹	498	<i>Klebsiella_pneumoniae_342_Plasm:p</i> KP187	[glutathione_ABC_transporter_pe rmease]
GsiD	7e ⁻¹⁷⁸	495	<i>Klebsiella_oxytoca_KCTC_1686_Plas</i> m:pKOX_NDM1	[glutathione_ABC_transporter_pe rmease_GsiD]
GsiD	7e ⁻¹⁷⁸	495	<i>Klebsiella_variicola_At_22_Plasm:pK</i> RH	[binding-protein- dependent_transporters_inner]
GsiC	1e ⁻¹⁷⁶	492	<i>Klebsiella_pneumoniae_342_Plasm:p</i> KP187	[glutathione_ABC_transporter_pe rmease]
GsiC	1e ⁻¹⁷⁶	492	<i>Klebsiella_variicola_At_22_Plasm:pK</i> RH	[binding-protein- dependent_transporters_inner]
GsiC	4e ⁻¹⁷⁵	489	<i>Klebsiella_oxytoca_KCTC_1686_Plas</i> m:pKOX_NDM1	[glutathione_ABC_transporter_pe rmease_GsiC]

Tabla III. Transportadores de glutatión encontrados en especies del género *Pseudomonas*.
T=Transportador, E=E-value, BS=Bit Score.

T	E	BS	Especie	Descripción
CydC	8e ⁻⁴³	160	<i>Pseudomonas</i> _protegens_CHA0_Plas m:pA506	[ABC_transporter_ATPbinding_pro tein_HI]
CydC	2e ⁻⁴³	161	<i>Pseudomonas</i> _putida_S16_Plas m:pPC9	[ABC_transporter_ATPbinding_pro tein]
CydC	3e ⁻⁴³	161	<i>Pseudomonas</i> _putida_ND6_Plas m:pND6-1	[ABC_transporter_ATPbinding_pro tein]
CydD	0.041	34	<i>Pseudomonas</i> _aeruginosa_DK2_Chro m:I	[ABC_transporter_ATPbinding_pro tein]
CydD	0.097	33	<i>Pseudomonas</i> _VLB120_Plas m:pDC300A	[ABC_transporter_ATPbinding_pro tein]
GsiA	0.0	608	<i>Pseudomonas</i> _putida_KT2440_Plas m:pPC9	[opine_ABC_transporter_ATPbindi ng_protein]
GsiA	3e ⁻¹⁵⁹	470	<i>Pseudomonas</i> _aeruginosa_PA7_Chro m:1	[glutathione_import_ATPbinding_p rotein_GsiA]
GsiA	6e ⁻¹⁵⁷	464	<i>Pseudomonas</i> _putida_H8234_Plas m:pND6-2	[microcin_C_ABC_transporter_AT P-binding_protein]
GsiB	6e ⁻⁶¹	209	<i>Pseudomonas</i> _syringae_pv_syringae_ B728a_Plas m:pPSEST03	[extracellular_solutebinding_protei n]
GsiB	4e ⁻⁶¹	209	<i>Pseudomonas</i> _aeruginosa_M18_Chro m:I	[putative_binding_protein_compon ent_of_ABC]
GsiB	1e ⁻⁶⁰	209	<i>Pseudomonas</i> _aeruginosa_SCV20265_ _Chrom:1	[Dipeptide- binding_ABC_transporter,_periplas mic]
GsiC	2e ⁻⁷⁴	232	<i>Pseudomonas</i> _putida_KT2440_Plas m:pPC9	[opine_ABC_transporter_substrate -binding_protein]
GsiC	1e ⁻⁷⁰	223	<i>Pseudomonas</i> _aeruginosa_PA1R_Ch rom:1	[Dipeptide_transport_system_perm ease_protein]
GsiC	1e ⁻⁷⁰	223	<i>Pseudomonas</i> _aeruginosa_MTB_1_Ch rom:I	[peptide_ABC_transporter_permea se]

VIII. Discusión

El presente estudio tuvo por objetivo principal evaluar si la cointeracción entre una bacteria resistente a la desecación y una bacteria sensible, mejora la supervivencia de la bacteria sensible al enfrentarse al estrés.

Los experimentos de cointeracción entre *K. variicola* T29A2 y *P. putida* KT2440 resultaron útiles para saber qué tipo de cointeracción es la que ayuda a *P. putida* KT2440 a resistir la desecación y elucidar posteriormente el mecanismo posible por el cual ocurre tal protección.

De acuerdo a los resultados, cuando *K. variicola* interactúa con *P. putida* únicamente durante el estrés, la viabilidad de *P. putida* se ve comprometida de la misma forma que cuando se somete al estrés por sí sola, no obstante, cuando ambas bacterias crecen juntas varias horas antes del estrés, *P. putida* sobrevive a la desecación con una tasa de supervivencia significativa (BSR=39.21, $P<0.0001$), lo cual demuestra que durante 24 horas de cointeracción *P. putida* se beneficia de *K. variicola* para tolerar posteriormente el estrés.

Lo anterior sugiere dos hechos importantes, el primero, que durante el crecimiento hasta la fase estacionaria, *K. variicola* podría sintetizar y exportar algunas moléculas que ejerzan el efecto protector; y el segundo, que *P. putida* es capaz de incorporar dichas moléculas para protegerse de la desecación, esto último se propone ya que al haberse removido por centrifugación el medio de cultivo y las sustancias en este como producto del crecimiento de ambas bacterias, las moléculas protectoras tuvieron que ser incorporadas por la bacteria sensible durante el crecimiento, y probablemente almacenadas durante el estrés.

Un primer paso para conocer cuáles son tales moléculas protectoras, fue evaluar la supervivencia de la bacteria sensible a la desecación en cointeracción con mutantes de *K. variicola* T29A2, para poder identificar a aquellas mutantes deficientes en la protección de *P. putida*, a través de las cuales se pudieron identificar los genes involucrados en conferir la resistencia a la desecación a la bacteria sensible.

Cabe mencionar que en este estudio se consideraron únicamente las mutantes que perdieron por completo la habilidad de proteger a *P. putida* de la desecación, no obstante, se identificaron también algunas mutantes con las que *P. putida* no perdió la viabilidad totalmente, lo que sugiere que probablemente existen otros genes que protegen en menor medida contra la desecación. Asimismo, al explorar otras mutantes de la banca que no habían sido exploradas, se encontraron algunas mutantes que aparentemente son

sensibles a la desecación (datos no mostrados), con lo cual, este estudio también contribuyó en la búsqueda de genes involucrados en la resistencia a la desecación de *K. variicola* T29A2 que la hacen altamente tolerante a este estrés.

Es importante mencionar que pese a haber identificado a las mutantes de interés mediante el método rápido, se realizaron experimentos de desecación estándar para corroborar que dichas mutantes protegían total o parcialmente a *P. putida* de la desecación, ya que existen diversos factores que pueden afectar los resultados obtenidos por cualquiera de los dos métodos (Corral-Lugo, 2010). En este caso, dichos factores incluyen principalmente el número de células que son sometidas al estrés, ya que además de que en el método rápido solo se someten 100 μ l y en el método estándar las alícuotas son de 500 μ l, el crecimiento de las bacterias puede afectar si estas no llegan hasta la fase estacionaria, etapa durante la cual se ha reportado que las bacterias se encuentran en mejor condición para enfrentar diversos tipos de estrés (Potts, 1994).

Gracias a la metodología de las PCRs arbitrarias, se logró amplificar un fragmento del gen mutagenizado en las mutantes deficientes en la protección de *P. putida* KT2440, lo cual facilitó la identificación de su función al comparar las secuencias de los amplificados en la base de datos pública del NCBI. De acuerdo a los resultados obtenidos, los genes involucrados en la protección de *P. putida* KT2440 contra la desecación incluyen reguladores transcripcionales de respuesta a elementos xenobióticos, una serina-O-acetiltransferasa involucrada en la síntesis de L-cisteína y una proteína hipotética cuya función aún no ha sido reportada en el banco de genes.

Los resultados de las pruebas de desecación con las mutantes 6 y 16 mostraron que además de perder la habilidad de proteger a *P. putida* KT2440, ellas mismas son sensibles a la desecación (Fig. 8 y 9), es por esto que la identificación de reguladores transcripcionales a partir estas dos mutantes sugiere que durante la desecación, *K. variicola* T29A2 usa diversas vías regulatorias para sensar y responder a las condiciones estresantes del medio, sin embargo, la forma en que se extiende dicha protección a *P. putida* vía regulación transcripcional no es fácil de elucidar.

Es importante tener en cuenta que al tratarse de un regulador de respuesta transcripcional, la relación con la protección a la bacteria sensible puede ser bastante amplia, incluso, al no tener mayor información sobre el gen más allá de ser un regulador de respuesta a elementos xenobióticos, el hecho por el que *P. putida* no se proteja del estrés podría ser

debido a la falta de regulación de moléculas detoxificantes en el interior de *K. variicola* que al no ser producidas, no puedan ser exportadas ni captadas por *P. putida* para combatir el estrés. No obstante, la red de regulación transcripcional puede ser a veces tan compleja que es difícil sacar una conclusión a partir de un gen de este tipo.

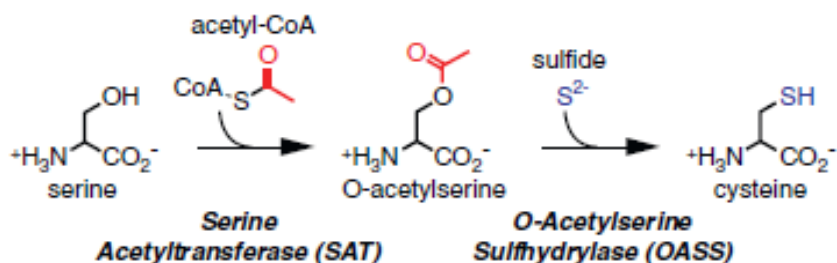
Se conoce que el estrés por desecación desencadena muchas respuestas a nivel transcripcional, uno de los pocos estudios que han podido demostrar qué genes se expresan durante la desecación, ha reportado la expresión de aproximadamente 70 reguladores transcripcionales en *B. japonicum* que incluyen el AMP cíclico, reguladores de respuesta de doble componente y factores sigma como σ^{54} (RpoN) y σ^{24} (RpoE) (Cytryn *et al.*, 2007), no obstante, haber encontrado un dominio que pertenece a la familia de las proteínas de unión a ADN en respuesta a xenobióticos sugiere que los reguladores identificados en las mutantes 6 y 16, pueden favorecer la transcripción de algunos antioxidantes que remuevan radicales libres de oxígeno y otras sustancias tóxicas, como catalasas, peroxidasas y superóxido dismutasas durante la desecación, como ocurre en *Anabaena* sp., *Bradirhizobium japonicum*, *Rhodococcus jostii* y *Deinococcus radiodurans* (Kato *et al.*, 2004; Cytryn *et al.*, 2007; LeBlanc, 2008; Karlin & Mrázek, 2001). Incluso, la elevada respuesta transcripcional de genes detoxificantes se ha observado en *D. geothermalis* y *D. radiodurans* como un mecanismo mucho más eficiente que sus sistemas de reparo de ADN (Makarova *et al.*, 2007).

Pese a todo lo anterior, una cuestión importante a la que debe darse lugar es si la pérdida de la habilidad de protección hacia la bacteria sensible es consecuencia de la mutación en el gen que codifica los reguladores transcripcionales en las mutantes 6 y 16 o es mera consecuencia de la pérdida de resistencia a la desecación de la mutante, es por esto que la interpretación de resultados con base a estas dos mutantes no suele ser tan clara, incluso la mutante 85 cuyo gen identificado correspondió a una proteína hipotética, no puede dar mayor información sobre qué papel tiene tal gen en la protección de *P. putida* debido a que su función no ha sido reportada.

Pese a lo anterior, los resultados con la mutante 51 mostraron mayores probabilidades de conocer el papel de la serina-O-acetyltransferasa en la protección de *P. putida* contra la desecación ya que por un lado, los análisis de alineamiento mostraron el mayor porcentaje de similitud con las muestras obtenidas por PCRs arbitrarias y por otra parte, la función del gen identificado se encuentra ampliamente reportada en la literatura. Cabe señalar que al

ser esta mutante muy resistente a la desecación por sí misma, se puede descartar la posibilidad de que la pérdida de protección hacia *P. putida* se deba a la incapacidad de la mutante de sobrevivir a la desecación.

La serina-O-acetiltransferasa (SAT) y la O-acetilserina sulfurilasa (OASS) forman un complejo denominado “complejo cisteína sintasa” que participa en una ruta biosintética de dos etapas que conducen a la formación de L-cisteína (Kredich *et al.*, 1969; Campanini *et al.*, 2005). Como primer paso en la síntesis de cisteína, SAT transfiere el grupo acetilo de un acetil-CoA a una serina para formar O-acetilserina, posteriormente, en la segunda reacción, OASS reemplaza el grupo acetoxi de la cadena lateral de la O-acetilserina por un tiol (-SH) obtenido del sulfuro inorgánico que actúa como donador tal como se indica en la siguiente reacción (Jez & Dey, 2013; Johnson *et al.*, 2005).



La actividad de SAT es regulada por retroalimentación del producto final, es decir, por la misma L-cisteína, la cual se une al C-terminal de la enzima e induce un cambio conformacional que previene la unión con otros acetil-CoA y con la enzima OASS evitando la formación del complejo cisteína sintasa para detener la producción de cisteína (Zhao *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2014).

De esta manera, las bacterias y plantas pueden asimilar e incorporar el sulfuro inorgánico a componentes esenciales para la célula como el aminoácido cisteína, el cual es posteriormente utilizado como metabolito principal para la síntesis de otros compuestos que contienen sulfuro, como metionina, glutatión, tripanotión, coenzima A, hipotaurina, taurina y cisteamina, que además tienen diversas funciones en la célula (Jeelani *et al.*, 2014; Bonner *et al.*, 2005).

Se ha reportado que las propiedades físicas y químicas de la L-cisteína son determinantes para su funcionalidad. Este aminoácido reacciona fácilmente con compuestos electrofílicos

gracias a que el grupo tiol de su estructura es fuertemente nucleofílico, es por esto también que la cisteína tiene alta afinidad por los metales y se le asocia con propiedades reductoras de sustancias oxidantes, de manera que al igual que otros tioles de bajo peso molecular, se emplea en buffers protectores para evitar los daños de la toxicidad por ROS (Poole, 2014; Fahey, 2013). No obstante, la alta reactividad del grupo tiol también hace que la L-cisteína se autooxide y sea altamente tóxica para la célula ya que los productos de tal autooxidación incluyen ROS que pueden causar daño directo al ADN (Park & Imlay, 2003; Fahey, 2013).

El hallazgo de una mutante alterada en la producción de la enzima serina-O-acetiltransferasa, una enzima crucial en la ruta de biosíntesis de cisteína, que deja de proteger a *P. putida* de la desecación, sugiere que posiblemente la cisteína tenga un papel muy importante durante el estrés; incluso si la cisteína no es directamente responsable de la protección contra la desecación, bien podrían ser algunos metabolitos sintetizados a partir de este aminoácido, los que ejerzan el efecto protector. Esto último es más probable, ya que se conoce que la cisteína atrae a los metales pesados y cataliza su autooxidación uno o dos órdenes de magnitud más rápido que la coenzima A o el glutatión, por lo que un mecanismo de la célula para disminuir la autooxidación de la cisteína, es utilizar este aminoácido manteniendo su concentración baja y en una forma menos sensible a la autooxidación que la cisteína libre, por ejemplo en forma de otros tioles de bajo peso molecular que incluyen homosisteína, coenzima A, ergotioneína, bacilitiol, micotiol, γ -glutamato-cisteína y glutatión, o en otras moléculas reductoras como las glutarredoxinas y tiorredoxinas (Fahey, 2013; Poole, 2014).

Todas estas formas alternativas, tienen una o dos cisteínas en sus sitios activos cuya función es reducir los puentes disulfuro en las proteínas citoplasmáticas, para mantener su función y el potencial redox en el citoplasma, asimismo la biosíntesis de cisteína en la célula ayuda a mantener un pool apropiado de tioles con los cuales atacar y detoxificar a la célula de especies reactivas de oxígeno (Turnbull & Surette, 2010; Poole, 2014).

Existen evidencias de que la cisteína y varios metabolitos con cisteína en su estructura tienen una función muy importante para enfrentar el estrés oxidativo. Un estudio con *Salmonella typhimurium* demostró que la L-cisteína es crucial para resistir el estrés oxidativo generado por la presencia de antibióticos durante la diferenciación al estado *swarm* de las células, ya que se observó que mutantes auxótrofas en la producción de L-

cisteína, disminuyen notablemente la concentración de tioles reducidos y glutatión en el citoplasma y como consecuencia, la célula queda susceptible a los radicales libres que genera la exposición de antibióticos como la ciprofloxacina, polymixina y gentamicina (Turnbull & Surette, 2010; Turnbull & Surette, 2008).

Otros estudios han demostrado que mutantes de *E. coli* en los genes *cysE* o *cysB* que codifican para la serina-O-acetiltransferasa, como es el caso de la mutante de interés en este estudio, y la O-acetilserina sulfurilasa respectivamente, son completamente incapaces de sintetizar cisteína y son altamente sensibles a la exposición de algunos agentes oxidantes como el telurito de potasio, cadmio y cromato, cuya oxidación genera radicales superóxido y causa un desequilibrio en el potencial redox intracelular (Fuentes *et al.*, 2007; Ackerley *et al.*, 2006; Helbig *et al.*, 2008).

Otros estudios mostraron la capacidad de la *N*-acetil-L-cisteína para reducir el daño oxidativo inducido por radiación ultravioleta en la cianobacteria *Anabaena* sp. (He & Häder, 2002); incluso el mismo efecto de la *N*-acetil-L-cisteína ha sido observado en el alga *Chlorella vulgaris* y la soya *Glycine max* var. Hood dando como resultado un incremento significativo de tioles totales y la evidente disminución de radicales libres generados por la radiación (Malanga *et al.*, 1999).

De acuerdo a lo anterior, la incapacidad de sintetizar cisteína tiene como principal consecuencia la disminución de tioles y antioxidantes en el citoplasma, considerando que la cisteína es parte estructural de los sitios activos de tales moléculas, es posible pensar que el efecto de protección hacia *P. putida* observado en el presente estudio sea debido a la incorporación de alguno de estos antioxidantes más que a la incorporación de cisteína libre.

La mayoría de las moléculas antioxidantes que se mencionaron anteriormente como formas alternativas para evitar la alta reactividad de la cisteína libre han sido halladas tanto en eucariotas como en procariotas; algunas como el bacilitiol deben su nombre a que han sido encontradas en géneros específicos como *Bacillus*. Sin embargo, pese al gran número de antioxidantes conocidos, el glutatión ha resultado ser el tiol más común y por tanto más estudiado en ambos dominios, con la diferencia de que en los procariotas se han observado también diversos homólogos del glutatión, lo que sugiere que la ruta biosintética del glutatión pudo haber evolucionado varias veces a lo largo del tiempo para tolerar el cambio de la toxicidad por la presencia del oxígeno en la atmósfera (Fahey *et al.*, 1978; Fahey,

2013).

El glutatión es considerado el agente principal en la manutención del ambiente intracelular y la protección de la célula contra el daño oxidativo en bacterias Gram-negativas, ya que está ausente en la mayoría de las Gram-positivas (Fahey *et al.*, 1978). Existen varios trabajos relacionados a la función del glutatión como primera respuesta contra el estrés oxidativo en vertebrados, plantas, levaduras, actinobacterias y diversos grupos de proteobacterias; incluso se ha encontrado que el glutatión también ejerce un efecto protector contra el estrés por congelación y durante la liofilización, ya que se demostró que *Lactobacillus sanfranciscensis* mantiene la estructura de su membrana intacta después de someterse a tales procedimientos cuando se agrega glutatión al medio durante su crecimiento (Zhang *et al.*, 2010).

Un mecanismo posible por el cual el glutatión podría proteger la membrana celular es que el glutatión prevenga la oxidación de los dobles enlaces de carbono de los ácidos grasos insaturados de la membrana evitando que pasen al estado saturado y la membrana pierda flexibilidad durante el estrés; esto ha sido demostrado en *S. cerevisiae* y *L. sanfranciscensis* los cuales al ser tratados previamente con glutatión, mostraron un aumento de ácidos grasos insaturados durante el estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno y el estrés por congelación respectivamente, así como la protección de los grupos sulfuro de las proteínas de membrana (Steels *et al.*, 1994; Espindola *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2010).

Es importante resaltar que el estrés por desecación implica también otros tipos de estrés, algunos autores mencionan que una de las características más importantes de los anhidrobiontes es que sufren menor daño oxidativo durante la desecación que los organismos sensibles y que aquellos organismos resistentes han desarrollado estrategias para contrarrestar la toxicidad del oxígeno aumentando la eficiencia de sus antioxidantes (Oliver *et al.*, 2001; Espindola *et al.*, 2003; França *et al.*, 2007; Kranner & Birtic, 2005). Incluso, se sugiere que el daño por estrés oxidativo podría ser la mayor causa de muerte celular durante la desecación ya que las ROS dañan directamente al ADN (Potts, 1994; Frederickson *et al.*, 2008).

Lo anterior podría explicar porqué una enzima involucrada en la síntesis de una parte estructural tan importante de algunos antioxidantes, tiene efectos relevantes en la supervivencia a la desecación. Sin embargo, sugerir que *P. putida* KT2440 podría incorporar algún antioxidante sintetizado por *K. variicola* T29A2 para sobrevivir a la

dsecación, implica que tal antioxidante debe ser exportado al medio.

Algunos estudios han demostrado que existen transportadores específicos de cisteína y de algunos tioles de bajo peso molecular, principalmente de glutatión, que expulsan o incorporan estas moléculas dentro y fuera de la célula. Diversos autores proponen que la síntesis de glutatión y otros antioxidantes, así como su transporte al interior y exterior celular son mecanismos para mantener un pool apropiado de cisteína en la célula (Smirnova *et al.*, 2012; Bachhawat *et al.*, 2013;), esto sugiere que *K. variicola*, como supuesta productora de los antioxidantes que utiliza *P. putida* para su protección, debe contar con transportadores que le permitan importar cisteína del medio o bien exportar antioxidantes con este aminoácido en su estructura para mantener el balance de cisteína intracelular.

Para corroborar que *K. variicola* cuenta con la capacidad de exportar cisteína, se realizó una búsqueda por alineamiento masivo en el banco de genes de transportadores específicos de cisteína y de glutatión, al ser el antioxidante más documentado. El análisis mostró que *K. variicola* posee sistemas tanto exportadores como importadores de glutatión que también se encuentran reportados como transportadores de cisteína, ya que se encontraron valores de similitud significativos con las secuencias de otros sistemas de importación y exportación de glutatión de otras especies previamente descritos con las que se realizó la búsqueda (Tabla II). Tales resultados confirman la posibilidad de que la cisteína o el glutatión sintetizado por *K. variicola* puede ser exportado al medio externo donde *P. putida* podría incorporarlos y utilizarlos como moléculas protectoras contra la desecación.

No obstante, este último hecho también implicaría que *P. putida* tiene al menos importadores específicos de glutatión o cisteína para poder incorporar estos péptidos del medio externo al citoplasma. De acuerdo a los resultados del análisis por alineamiento masivo, los valores significativos de alineamiento se observaron únicamente con sistemas de importación de glutatión en el género *Pseudomonas*, contrario a los sistemas de exportación que pese a que se encontraron en algunas especies del género, no se tomaron en cuenta por no tener valores significativos de similitud con las secuencias comparadas. Específicamente *P. putida* KT2440 presentó el mayor valor de significancia con una proteína de unión a ATP reportada en la base de datos pública como una de las partes de un transportador de opinas (Tabla III).

Las opinas son aminoácidos poco comunes derivados de carboxietil o dicarboxipropilarginina y del ácido glutámico y manitol; en general son péptidos pequeños

y de bajo peso molecular que son usados como fuente de carbono y nitrógeno por algunas bacterias (Venturi & Fuqua, 2013). Estas moléculas se conocen bien en *Agrobacterium tumefaciens*, que posee genes para el catabolismo de distintas opinas codificados en el plásmido Ti. Cuando *A. tumefaciens* transforma su material genético a las plantas que infecta, induce una elevada síntesis de opinas; de las cuales se nutre para poder establecerse y sobrevivir en los tumores causados a la planta (Kim & Farrand, 1996). Aunque la mayoría de opinas fueron descritas a partir de ambientes tumorales se ha encontrado que las opinas son utilizadas por otras bacterias que no pertenecen al género *Agrobacterium*, principalmente por diversas Pseudomonadaceas y Rhizobacterias (Bergeron *et al.*, 1990).

La estructura química de las opinas sugiere que estas podrían ser transportadas por un sistema similar al del glutatión o cisteína, lo que podría explicar la similitud entre las secuencias de transportadores de glutatión comparadas y el sistema de transporte de opinas en *P. putida* KT2440. Dado que se ha reportado que el glutatión no siempre requiere de transportadores específicos, es posible que este sistema de importación de opinas hallado en *P. putida* pudiera ser el que incorpore la cisteína o glutatión sintetizados por *K. variicola*, sin embargo, aún no existen reportes de que tal sistema de *P. putida* también cumpla la función de incorporar antioxidantes de bajo peso molecular para su protección, no obstante, para *Haemophilus influenzae*, un auxótrofo natural de cisteína y glutatión, las dipéptido permeasas codificadas en el operón DppBCDF son capaces de importar glutatión del medio extracelular; estas dipéptido permeasas aunque no son específicas para el transporte de glutatión, mostraron tener una alta afinidad al glutatión al igual que a otros péptidos pequeños (Vergauwen *et al.*, 2003).

En la literatura, hay un gran número de reportes sobre la circularización de glutatión dentro y fuera de la célula. En *E. coli*, se ha observado que cuando el glutatión reducido (GSH) en su forma activa, reacciona con ROS y otros elementos tóxicos, se convierte a su forma oxidada (GSSH), la cual si se acumula dentro de la célula es altamente tóxica, por lo que la célula expulsa el glutatión oxidado al exterior donde puede volver a su forma reducida gracias a las condiciones del medio externo; una vez en su forma activa, puede ser incorporado de nuevo para reutilizarlo contra más ROS dentro de la célula (Smirnova *et al.*, 2012; Smirnova & Oktyabrsky, 2005). Otros autores mencionan que el transporte de glutatión además de ser útil para enfrentar el estrés oxidativo, también sirve para incorporar cisteína del medio externo como fuente de sulfuro para el metabolismo de la célula (Poole,

2014), no obstante, en el presente estudio, podemos descartar que el importe de glutatión o cisteína haya ocurrido para el metabolismo de alguna de las dos bacterias estudiadas, ya que tanto *K. variicola* como *P. putida* cointeraccionaron en un medio rico; sin embargo, de acuerdo a lo anterior, podemos sugerir que pese a que *K. variicola* exportara glutatión en forma oxidada y tóxica, *P. putida* podría incorporar y reciclar esas moléculas una vez vueltas a su forma activa en el medio externo.

Aunque mucho en la literatura parece indicar que la ausencia de glutatión como consecuencia de la falta de cisteína en la célula podría ser la causa de la disminución de la supervivencia frente a diferentes tipos de estrés, es importante tener en cuenta que el glutatión no es el único agente protector contra el estrés oxidativo, una sola célula puede sintetizar diversas moléculas protectoras contra el daño oxidativo e incluso responder a este estrés con vías alternativas a la síntesis de cisteína como la expresión de los regulones oxyR y soxRS, que son bien conocidos por ser una defensa antioxidante adicional a través de los cuales se expresan diferentes enzimas específicas como las catalasas y las superóxido dismutasas tal y como ha sido observado en mutantes auxótrofos de cisteína de *S. typhimurium* (Fuentes *et al.*, 2007; Turnbull & Surette, 2010).

Otros estudios han demostrado que la síntesis de glutatión y otras moléculas reductoras como la tioredoxina 1, tioredoxina 2 y tioredoxina reductasa no son esenciales para la supervivencia de *E. coli* (Fuentes *et al.*, 2007); este hecho, al igual que la posible expresión de otras vías de defensa contra el estrés oxidativo y la síntesis de diversas moléculas antioxidantes explica por qué la mutante de interés (mutante 51) de este estudio pudo sobrevivir al estrés por desecación por sí misma sin ser capaz de sintetizar cisteína; lo cual sugiere que puede contar con otros antioxidantes que le ayuden a resistir el estrés y que pueda no exportar para beneficio de *P. putida*.

Por otra parte, respecto a *P. putida* KT2440, existen algunos estudios sobre su tolerancia al estrés oxidativo ya que es considerada como una bacteria capaz de mineralizar compuestos tóxicos que generan radicales superóxido y peróxido de hidrógeno; en relación a esto únicamente se ha reportado que *P. putida* cuenta con un homólogo al regulón SoxR de *E. coli*, no obstante, este homólogo ha resultado funcionar de forma diferente al regulón SoxR de *E. coli* y *S. typhimurium*, ya que se encontró que ninguno de los genes de *P. putida* inducidos por estrés oxidativo es dependiente de este operón (Park *et al.*, 2006).

Otros estudios con *P. aeruginosa* mostraron resultados similares que sugieren que SoxR

no es un regulador clave para la respuesta al estrés oxidativo (Palma *et al.*, 2005). Por otro lado, algunos estudios proteómicos han demostrado que el estrés por congelación también induce una respuesta antioxidante; en *P. fluorescens* BA3SM1 se observaron incrementos notables en la expresión de muchas proteínas involucradas en la resistencia al estrés oxidativo como las aldehído deshidrogenasas, oxidorreductasas, diversos sistemas de transporte ABC y la lactocil-glutación-liasa, esta última confirma la participación del glutatión para combatir el estrés oxidativo causado por bajas temperaturas (Poirier *et al.*, 2014).

Lo anterior sugiere que al menos en el género *Pseudomonas*, el glutatión también tiene una función importante contra el estrés oxidativo, incluso, se encontró que *P. putida* KT2440 es capaz de sintetizar glutatión y cisteína por la misma ruta biosintética que *K. variicola*, sin embargo, como se mencionó en la sección anterior, la secuencia del gen que codifica la serina-O-acetiltransferasa de ambas bacterias no es homóloga ni presenta ninguna similitud (datos no mostrados).

De acuerdo a lo observado en este estudio, la diferencia en la supervivencia a la desecación de *P. putida*, aparentemente radica en la imposibilidad de *K. variicola* de sintetizar cisteína mediante esta enzima, pero considerando que *P. putida* puede sintetizar estas moléculas por sí misma, una explicación posible sería que el pool de cisteína o glutatión sea mayor con la aportación de estas moléculas al medio por *K. variicola*, lo cual aumentaría su biodisponibilidad para *P. putida* y su posible incorporación para tolerar el estrés posteriormente, considerando también que la incorporación de solutos del medio podría ser mucho más favorable energéticamente que su síntesis durante el estrés pudiendo observar una mejor supervivencia en la bacteria. No obstante, esto también podría sugerir que el antioxidante exportado por *K. variicola* es de otro tipo o de mayor potencia que el glutatión para poder ejercer un mejor efecto en *P. putida* y refuerza aún más la idea de que no es la cisteína la que participa directamente en la protección de *P. putida* contra la desecación, sino una molécula sulfurada que por las características ya descritas anteriormente podría tratarse de un antioxidante.

Esto último además sugiere que uno de los daños más significativos que sufre *P. putida* cuando se somete a la desecación es el daño oxidativo, por lo que más allá de intentar mejorar su supervivencia con disacáridos, exudados de raíces y en cointeracción con bacterias resistentes a la desecación como se ha realizado en otros trabajos y el presente estudio, su supervivencia podría prolongarse con ayuda de antioxidantes adicionados de forma exógena como pretratamiento, pudiendo evitar el daño a la membrana celular e

impedir el paso de la bacteria al estado viable no cultivable cuando se enfrente al estrés en condiciones fuera de laboratorio.

Se ha mencionado que la acumulación de solutos compatibles y disacáridos es el mecanismo principal de los organismos tolerantes a la desecación, dado que es el mejor conocido, sin embargo, los estudios más recientes han mostrado que la supervivencia de las células en condiciones de desecación es un fenómeno complejo que involucra un conjunto de mecanismos coordinados de los cuales los solutos compatibles representan un solo aspecto (França *et al.*, 2007). Los resultados de este estudio muestran la importancia de otros tipos de estrés involucrados en la desecación así como lo han hecho otros estudios que demuestran la correlación entre la tolerancia a la desecación y el incremento del potencial antioxidante para enfrentar el daño oxidativo (Kranner *et al.*, 2005; França *et al.*, 2007; Espindola *et al.*, 2003).

Asimismo, el presente estudio permitió conocer un mecanismo distinto a los ya reportados sobre la cointeracción benéfica entre especies, ya que la mayoría de estudios sobre cointeracción se enfocan a la coexistencia de dos o más especies bacterianas durante la formación de biofilm enfrentando algunos tipos de estrés ejercidos por la presencia de antibióticos y diversos compuestos orgánicos (Simoes *et al.*, 2008; Cowan *et al.*, 2000; Burmolle *et al.*, 2013; Narisawa *et al.*, 2008). En contraste, este estudio mostró la capacidad de una bacteria sensible para beneficiarse de otra resistente incluso antes de ser sometida al estrés, lo que podría explicar cómo es que *P. putida* se encuentra tan ampliamente distribuida y es considerada como una bacteria con alto grado de adaptabilidad a las condiciones de los hábitats que coloniza.

Ya que *P. putida* KT2440 es considerada una bacteria de gran interés por sus habilidades de biorremediación (Margesin & Schinner, 2001; Ramos-González *et al.*, 2001; Jiménez *et al.*, 2002), y recientemente por su habilidad de promover el crecimiento en plantas (Morales-García, 2011); los resultados de este estudio pueden contribuir al mantenimiento o mejora de su supervivencia en condiciones de desecación, lo cual es relevante si esta bacteria se aplica o utiliza en inoculantes bacterianos para mejorar el crecimiento de cultivos o biorremediar suelos expuestos a periodos largos de sequía en regiones áridas o semiáridas.

Respecto a lo anterior, los resultados de este estudio también pueden ser utilizados como criterio para la selección de especies que integren un inoculante, ya que podrán seleccionarse buenas cepas promotoras del crecimiento pese a ser sensibles a la

dsecación, siempre y cuando se coloquen en conjunto con otras que sean resistentes al estrés por dsecación en vista de que no siempre las bacterias que mejor promueven el crecimiento son las mas resistentes a diversos tipos de estrés.

Cabe señalar que en estudios posteriores, la herramienta bioinformática utilizada en este trabajo tiene mayores alcances, ya que una vez caracterizada la molécula o moléculas protectoras, se podrá realizar la búsqueda masiva de especies bacterianas productoras de tales moléculas y de las especies con transportadores capaces de incorporarlas para su protección, pudiendo hacer conjuntos de especies compatibles que logren tal efecto benéfico entre ellas y posteriormente ir diseñando nuevos inoculantes bacterianos.

Finalmente, es importante resaltar que elucidar en lo mayor posible los distintos mecanismos de resistencia contra la dsecación permitirá desarrollar nuevos métodos para preservar materiales biológicos que normalmente no resisten la deshidratación, lo cual es de gran importancia para la industria, particularmente para la industria médica y agrícola.

IX. Conclusiones

- Los modelos de estudio utilizados en este trabajo, *P. putida* KT2440 como bacteria sensible y *K. variicola* T29A2 como bacteria resistente, mostraron que la supervivencia a la desecación de la bacteria sensible que ha interactuado previamente con la resistente, mejora significativamente respecto a su supervivencia cuando es sometida al estrés por sí sola ($p < 0.0001$).
- La protección de *P. putida* KT2440 ocurre cuando cointeracciona con *K. variicola* T29A2 varias horas antes de someterse al estrés por desecación, lo cual implica que *P. putida* podría incorporar determinadas moléculas sintetizadas por *K. variicola* para tolerar el estrés.
- Mediante las PCRs arbitrarias, se amplificó una región adyacente al transposón miniTn5 insertado en el gen mutado en las 4 mutantes de interés, lo que permitió identificar la función de estos genes en la protección de *P. putida* KT2440 contra la desecación.
- Los genes identificados en este estudio, que aparentemente tienen un papel importante en la protección de *P. putida* KT2440 contra la desecación, corresponden a dos reguladores transcripcionales con un dominio de unión a ADN en respuesta a elementos xenobióticos, una proteína hipotética cuya función no está reportada en el banco de genes, y una serina-O-acetiltransferasa involucrada en la síntesis de cisteína.
- Se determinó la posible función de la serina-O-acetiltransferasa en la protección de *P. putida* KT2440 contra la desecación, ya que fue el gen que presentó mayor similitud con la secuencia obtenida de una de las mutantes de interés mediante PCRs arbitrarias (Ident=100%).
- Dado que gran parte de la literatura menciona al glutatión como el principal antioxidante cuya cisteína en su sitio activo es crucial para su función protectora contra el daño oxidativo, se realizó una búsqueda por alineamiento masivo de transportadores de glutatión en diversas especies del género *Pseudomonas* y *Klebsiella*, el cual mostró que *K. variicola* presenta tanto sistemas de exportación

como de importación de glutatión, mientras que *P. putida* KT2440 únicamente mostró similitud con un sistema de importación de glutatión reportado en como un transportador de opinas.

- De acuerdo a los resultados del análisis por alineamiento masivo, este estudio sugiere que *K. variicola* T29A2 es capaz de exportar antioxidantes como el glutatión durante su crecimiento en cointeracción con *P. putida* KT2440, y que esta última podría importar tales antioxidantes del medio externo para protegerse posteriormente de la desecación.

X. Perspectivas

- Seguir explorando la banca de mutantes de *K. variicola* T29A2 en busca de otras mutantes que pierdan por completo la habilidad de proteger a *P. putida* KT2440 de la desecación, con la finalidad de identificar los genes de mayor importancia en este mecanismo de cointeracción benéfica.
- Realizar la complementación del gen *sat* de la mutante 51 para confirmar molecularmente su participación en la protección de *P. putida* KT2440 contra la desecación.
- Una vez complementada tal mutante, evaluar si *P. putida* KT2440 sobrevive al estrés por desecación como lo hace cuando cointeracciona con *K. variicola* T29A2 silvestre.
- Habiendo recuperado el fenotipo de interés en *P. putida* KT2440, evaluar su supervivencia a la desecación con la adición exógena de cisteína, glutatión o de diferentes tioles de bajo peso molecular, que de acuerdo a los resultados de este estudio, son los más probablemente involucrados en la protección de *P. putida* contra este estrés.
- Evaluar la supervivencia a la desecación de *P. putida* KT2440 después de crecer en el sobrenadante de un cultivo de *K. variicola* T29A2, con la finalidad de comprobar si se cumple el mismo efecto protector observado cuando cointeraccionan físicamente ambas bacterias.
- Identificar y caracterizar químicamente el metabolito producido por *K. variicola* T29A2 responsable de la protección contra la desecación, para posteriores aplicaciones en la protección y preservación de microorganismos.
- Ante la relación filogenética de *K. variicola* T29A2 con otras especies patógenas del género *Klebsiella*, es conveniente continuar la búsqueda de bacterias no patógenas y promotoras del crecimiento en plantas que sean altamente resistentes a la desecación para explorar su capacidad de proteger a bacterias sensibles, con posibilidades futuras de diseñar nuevos inoculantes bacterianos.

XI. Referencias

- Abe, A., E. Ohashi, H. Ren, T. Hayashi & H. Endo. 2007. Isolation and characterization of a cold-induced nonculturable suppression mutant of *Vibrio vulnificus*. *Microbiological Research*, 162:130-138.
- Ackerley, D. F., Y. Barak, S. V. Lynch, J. Curtin & A. Martin. 2006. Effect of Chromate Stress on *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 188(9):3371-3381.
- Alexander, E., D. Pham & T. R. Steck. 1999. The Viable but Nonculturable condition is Influenced by Copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8):3754-3756.
- Alpert P. 2005. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. *Integr. Comp. Biol.* 45: 685-695.
- Aguirre-Medina, J. F. 2006. Biofertilizantes microbianos: experiencias agronómicas del programa nacional del INIFAP en México. Libro Técnico Núm. 2. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Rosario Izapa, Tuxtla Chico, Chiapas, México.
- Ambur, O. H., T. Davidsen, S. A. Frye, S. V. Balasingham, K. Lagesen, T. Rognes & T. Tonjum. 2009. Genome dynamics in major bacterial pathogens. *FEMS Microbiol Rev*, 33:453-470.
- Amel, B. K.N., B. Amine & B. Amina. 2008. Survival of *Vibrio fluvialis* in seawater under starvation conditions. *Microbiological Research*, 163:323-328.
- Apse, M. P. & E. Blumwald. 2002. Engineering salt tolerance in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 13:146-150.
- Bachhawat, A. K., A. Thakur, J. Kaur & M. Zulkifi. 2013. Glutathione transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830:3154-3164.
- Baliarda, A., H. Robert, M. Jebbar, C. Blanco, A. Deschamps & C. Le Marrec. 2003. Potential osmoprotectants for the lactic acid bacteria *Pediococcus pentosaceus* and *Tetragenococcus halophila*. *International Journal of Food Microbiology*, 84:13-20.
- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 16(4):729-770.
- Bashan Y. & G. Holguin. 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) and PGPB. *Soil Biol. Biochem.* 8: 1225-1228.
- Bashan, Y., B. Salazar & M. E. Puente. 2009. Responses of native legume desert trees used for reforestation in the Sonoran Desert to plant growth-promoting microorganisms in screen house. *Biol Fertil Soils*, 45:655-662.
- Bates, T. C. & J. D. Oliver. 2004. The Viable But Nonculturable State of Kanagawa Positive and Negative Strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *The Journal of Microbiology*, 42(2):74-79.
- Battaglia, M., Y. Olvera-Carrillo, A. Garcíarrubio, F. Campos & A. A. Covarrubias. 2008. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiology*, 148:6-24.
- Bergeron, J., R. A. MacLeod & P. Dion. 1990. Specificity of Octopine Uptake by *Rhizobium* and *Pseudomonas* Strains. *App. Environ. Microbiol.* 56(5):1453-1458.
- Bjerketorp, J., S. Hakansson, S. Belkin & J. K. Jansson. 2006. Advances in preservation methods: keeping biosensor microorganisms alive and active. *Curren Opinion in Biotechnology*, 17:43-49.
- Bloemberg, G. V. & B. J. Lugtenberg. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 343-350.
- Boyer J. S. 1982. Plant Productivity and Environment. *Science* 218: 443-448.
- Bonner, E. R., R. E. Cahoon, S. M. Knapke & J. M. Jez. 2005. Molecular Basis of Cysteine Biosynthesis in Plants: Structural and Functional Analysis of O-Acetylserine Sulfhydrylase from

- Arabidopsis thaliana*. J. Biol. Chem. 280:38803-38813.
- Broadbent, J. R., D. J. McMahon, D. L. Welker, C. J. Oberg & S. Moineau. 2003. Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: A review. J. Dairy Sci. 86:407-423.
- Burmolle, M., D. Ren, R. Bjarnsholt & S. J. Sorensen. 2013. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? Trends in Microbiol. 22(2):84-91.
- Campanini, B., F. Speroni, E. Salsi, P. F. Cook, S. L. Roderick, B. Huang, S. Bettati & A. Mozzarelli. 2005. Interaction of serine acetyltransferase with O-acetylserine sulfhydrylase active site: Evidence from fluorescence spectroscopy. Protein Science, 14:2115-2124.
- Castellanos, J. Z., J. X. Uvalle Bueno & A. Aguilar Santelises. 2000. Manual de interpretación de análisis de suelos y aguas agrícolas, plantas y ECP. Instituto de Capacitación para la Productividad Agrícola. Celaya, Gto. México.
- Chakrabortee, S., C. Boschetti, L. J. Walton, S. Sarkar, D. C. Rubinsztein & A. Tunnacliffe. 2007. Hydrophilic protein associated with desiccation tolerance exhibits broad protein stabilization function. PNAS, 104(46):18073-18078.
- Chakrabarti, R., & C.E. Schutt. 2001. The enhancement of PCR amplification by low molecular weight amides, Nucleic Acids Res. 29:2377-2381.
- Claeys, H., S. Van Landeghem, M. Dubois, K. Maleux & D. Inzé. 2014. What is stress? Dose-response effects in commonly used in vitro stress assays. Plant Physiology. 165: 519-527.
- Collén, J. & I. R. Davison. 1999. Stress tolerance and reactive oxygen metabolism in the intertidal red seaweeds *Mastocarpus stellatus* and *Chondrus crispus*. Plant, Cell and Environment, 22:1143-1151.
- Cook, K. L., & C. H. Bolster. 2007. Survival of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* in groundwater during prolonged starvation at low temperatures. J. Appl. Microbiol. 103, 573-583.
- Corral-Lugo A. 2010. Determinación de genes de resistencia a desecación por mutagénesis al azar, en *Klebsiella variicola* T29A2 del tipo PGPR. Tesis de posgrado para obtener el título de Maestría en Ciencias Microbiológicas. CICM-ICUAP.
- Cowan, S.E., E. Gilbert, D. Liepman & J. D. Keasling. 2000. Commensal interactions in a dual-species biofilm exposed to mixed organic compounds. App. Environ. Microbiol. 66:4481-4485.
- Crowe, L. M. 2002. Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis. Comparative Biochemistry and Physiology Part A 131:505-513.
- Crowe, J. H., L. M. Crowe, A. E. Oliver, N. Tsvetkova, W. Wolkers & F. Tablin. 2001. The trehalose Myth Revisited: Introduction to a Symposium on Stabilization of Cells in the Dry State. Cryobiology, 43: 89-105.
- Cushman, J. C. & H. J. Bohnert. 2000. Genomic approaches to plant stress tolerance. Current Opinion in Plant Biology. 3:117-124.
- Cytryn E. J., D. P. Sangurdekar, J. G. Streeter, W. L. Franck, W. S. Chang, G. Stacey, D. W. Emerich, T. Joshi, D. Xu & M. J. Sadowsky. 2007. Transcriptional and physiological responses of *Bradyrhizobium japonicum* to desiccation-induced stress. L. Bacteriol. 19: 6751-6762.
- Da Costa, M. S., H. Santos, E. A. Galinski & G. Antranikian. 1998. An Overview of the Role and Diversity of Compatible Solutes in Bacteria and Archaea. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 61: 117-153.
- Darcan, C. R. Özkanca, O. İdil & K. P. Flint. 2009. Viable but Non-Culturable State (VBNC) of *Escherichia coli* Related to EnvZ under the Effect of pH, Starvation and Osmotic Stress in Sea Water. Polish Journal of Microbiology, 58(4):307-317.
- De Weert, S., H. Vermeiren, I. H. Mulders, I. Kuiper, N. Hendrickx, G. V. Bloemberg, J. Vanderleyden, R. De Mot & B. J. Lugtenberg. 2002. Flagelladriven chemotaxis towards exudates components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. Mol. Plant

- Microbe Interact. 15:1173-1180.
- Duque, E., A. J. Molina-Henares, J. de la Torre, M. A. Molina-Henares, T. del Castillo, J. Lam & J. L. Ramos. 2007. Towards a genome-wide mutant library of *Pseudomonas putida* strain KT2440. In: Juan-Luis Ramos and Alain Filloux (eds.), *Pseudomonas*, 227 - 251.
- Empadinhas, N. & M. S. da Costa. 2008. To be or not to be a compatible solute: Bioversatility of mannosylglycerate and glucosylglycerate. *Systematic and Applied Microbiology* 31:159-168.
- Espindola, A. de S., D. S. Gomes, A. D. Panek & E. C. A. Eleutherio. 2003. The role of glutathione in yeast dehydration tolerance. *Cryobiol.* 47:236-241.
- Espinosa-Urgel, M., R. Kolter & L. Ramos. 2002. Root colonization by *Pseudomonas putida*: love at first sight. *Microbiology.* 148: 341-343.
- Escribano-Antemate, O., L. López-Reyes, Y. E. Morales-García & J. Muñoz-Rojas. 2007. Resistencia a desecación natural, de bacterias tipo PGPR del género *Klebsiella*. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Michoacán, Morelia. 25-29 p.
- Fahey, R. C. 2013. Glutathione analogs in prokaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830:3182-3198.
- Fahey, R. C., W. C. Brown, W. B. Adams & M. B. Worsham. 1978. Occurrence of Glutathione in Bacteria. *J. Bacteriol.* 133(3):1126-1129.
- Ferjani A., L. Mustardy, R. Sulpice, K. Marin, I. Suzuki, M. Hagemann & N. Murata. 2003. Glucosylglycerol, a Compatible Solute, Sustains Cell Division under Salt Stress. *Plant Physiol.* 131: 1628-1637.
- Flores-Molina, M. R., D. Thomas, C. Lovazzano, A. Núñez, J. Zapata, M. Kumar, J. A. Correa & L. Contreras-Porcia. 2014. Desiccation stress in intertidal seaweeds: Effects on morphology, antioxidant responses and photosynthetic performance. *Aquatic Botany*, 113:90-99.
- Fouts, D. E., H. L. Tyler, R. T. DeBoy, S. Daugherty, Q. Ren, et al. 2008. Compatible genome sequence of the N₂ fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. *PLoS Genet* 4(7):e1000141.
- França, M. B., A. D. Panek & E. C. A. Eleutherio. 2007. Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comp. Biochem. Physiol. A* 146:621-631.
- Fredrickson, J. K., W. L. Shu-mei, E. K. Gaidamakova, V. Y. Matrosova, M. Zhai, H. M. Sulloway, J. C. Scholten, M. G. Brown, D. L. Balkwill & M. J. Daly. 2008. Protein oxidation: key to bacterial desiccation resistance? *International Society for Microbial Ecology*, (2):393-403.
- Fuentes, D. E., E. L. Fuentes, M. E. Castro, J. M. Pérez, M. A. Araya, T. G. Chasteen, S. E. Pichuantes & C. C. Vásquez. 2007. Cysteine Metabolism-Related Genes and Bacterial Resistance to Potassium Tellurite. *J. Bacteriol.* 189(24):8953-8960.
- Garg, A. K., J.K. Kim, T.G. Owens, A.P. Ranwala, Y.D. Choi, L.V. Kochian & R. Wu. 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *PNAS*, 99(25):15898–15903.
- Garmiri, P., K. E. Coles, T. J. Humphrey & T. A. Cogan. 2008. Role of outer membrane lipopolysaccharides in the protection of *Salmonella* entérica serovar *Typhimurium* from dessication damage. *FEMS Microbiol. Lett*, 281:155-159.
- Gerstel, U. & U. Römling. 2003. The csgD promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella typhimurium*. *Research in Microbiology*, 154, 659–667.
- Gouffi, K., V. Pichereau, J. P. Rolland, D. Thomas, T. Bernad & C. Blanco. 1998. Sucrose is a Nonaccumulated Osmoprotectant in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 180:5044-5051.
- Grey, B. & T. R. Steck. 2001. Concentrations of Copper Thought to be Toxic to *Escherichia coli* can Induce the Viable but Nonculturable Condition. *Applied and Enviromental Microbiology*, 67(11):5325-5327.
- Groppa, M. D., M. P. Benavides & M. S. Zawoznik. 2012. Root hydraulic conductance, aquaporins and plant growth promoting microorganisms: A revisión. *Applied Soil Ecology* 61:247–254.

- Halverson, L. J. & M. K. Firestone. 2000. Differential Effects of Permeating and Nonpermeating Solutes on the Fatty Acid Composition of *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6):2414-2421.
- Hand, S. C., M. A. Menze, M. Toner, L. Boswell & D. Moore. 2011. LEA Proteins During Water Stress: Not Just for Plants Anymore. *Annu. Rev. Physiol.* 73:115–34.
- He, Y-Y. & D-P. Häder. 2002. UV-B induced formation of reactive oxygen species and oxidative damage of the cyanobacterium *Anabaena* sp.: protective effects of ascorbic acid and *N*-acetyl-L-cysteine. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 66:115-124.
- Helbig, K., C. Grosse & D. H. Nies. 2008. Cadmium Toxicity in Glutathione Mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 190(15):5439-5454.
- Hernández-Flores, L., J. A. Munive-Hernández, E. Sandoval-Castro, D. Martínez-Carrera & Ma. C. Villegas-Hernández. 2011. Poblaciones Bacterianas Nativas: Alternativa Sustentable para la Agricultura. *Terra Latinoamericana*, 30:129 – 138.
- Hernández-García, A. 2011. Anhydrobiosis in bacteria: From physiology to applications. *J. Biosci.* 36(5): 1–12.
- Hohmann, S., R. M. Bill, G. Kayingo & B. A. Prior. 2000. Microbial MIP channels. *Trends in Microbiology*, 8(1):33-38.
- Imai, R., L. Chang, A. Ohta, E. Bray & M. Takagi. 1996. A lea-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 170(2):243-248.
- Jeelani, G., D. Sato, T. Soga, H. Watanabe, T. Nozaki. 2014. Mass Spectrometric Analysis of L-Cysteine Metabolism: Physiological Role and Fate of L-Cysteine in the Enteric Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica*. *mBio* 5(6):e01995-14.
- Jez, J. M. & S. Dey. 2013. The cysteine regulatory complex from plants and microbes: what was old is new again. *Current Opinion in Structural Biology*, 23:302-310.
- Jiménez J. I., B. Miñambres, J. L. García & E. Díaz. 2002. Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 4: 824-841.
- Johnson, C. M., S. L. Roderick & P. F. Cook. 2005. The serine acetyltransferase reaction: acetyl transfer from an acylpantothenyl donor to an alcohol. *Arch. Biochem. Biophys.* 433:85-95.
- Junker, F. & J. L. Ramos. 1999. Involvement of the cis/trans Isomerase Cti in Solvent Resistance of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Journal of Bacteriology*, 181(18):5693-5700.
- Kana, B. D., B. G. Gordhan, K. J. Downing, N. Sung, G. Vostroktunova, E. E. Machowski, L. Tsenova, M. Young, A. Kaprelyants, G. Kaplan & V. Mizrahi. 2008. The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth *in vitro*. *Mo. Microbiol.* 67(3):672-684.
- Karlin, S. & J. Mrázek. 2001. Predicted highly expressed and putative alien genes of *Deinococcus radiodurans* and implications for resistance to ionizing radiation damage. *PNAS*, 98(9):5240-5245.
- Katoh, H., R. K. Asthana & M. Ohmori. 2004. Gene expression in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120 under desiccation. *Microb. Ecol.* 47:164-174.
- Kieft, T. L., D. B. Ringleberg, and D. C. White. 1994. Changes in ester-linked phospholipid fatty acid profiles of subsurface bacteria during starvation and desiccation in a porous medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3292–3299.
- Kim, K-S. & S. K. Farrand. 1996. Ti Plasmid-Encoded Genes Responsible for Catabolism of the Crown Gall Opine Mannopine by *Agrobacterium tumefaciens* are Homologs of the T-Region Genes Responsible for Synthesis of this Opine by the Plant Tumor. *J. Bacteriol.* 178(11):3275-3284.
- Kranner, I., R. P. Beckett, S. Wornik, M. Zorn & H. W. Pfeifhofer. 2002. Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidant status. *The Plant Journal*, 31(1):13-24.
- Kranner, I. & S. Birtic. 2005. A Modulating Role for Antioxidants in Desiccation Tolerance. *Integr.*

- Comp. Biol. 45:734-740.
- Kredich, N. M., M. A. Becker & G. M. Tomkins. 1969. Purification and characterization of cysteine synthetase, a bifunctional protein complex, from *Salmonella typhimurium*. J. Biol. Chem. 244:2428-2439.
- LeBlanc, J. C., E. R. Gonçalves & W. W. Mohn. 2008. Global Response to Desiccation Stress in the Soil Actinomycete *Rhodococcus jostii* RHA1. Applied and Environmental Microbiology, 74 (9): 2627-2636.
- Leslie S. B., E. Israeli, B. Lighthart, J. H. Crowe & L. M. Crowe. 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. Appl. Environ. Microbiol. 10: 3592-3597.
- Leprince, O. & J. Buitink. 2010. Desiccation tolerance: From genomics to the field. Plant Science, 179: 554 – 564.
- LI You-zhi, FAN Xian-wei & LIAO Jiang-xiong. 2012. Foci of Future Studies on Abiotic Stress Tolerance of Maize in the Era of Post-Genomics. Journal of Integrative Agriculture. 11(8): 1236-1244.
- Li, L., N. Mendis, H. Trigui, J. D. Oliver & S. P. Faucher. 2014. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. Frontiers in Microbiology – Microbial Physiology and Metabolism, 5(258):1-20.
- Liu Y., W. Gao, Y. Wang, L. Wu, X. Liu, T. Yan, E. Alm, A. Arkin, D. K. Thompson, M. W. Fields and J. Zhou. 2005. Transcriptome analysis of *Shewanella oneidensis* MR-1 in response to elevated salt conditions. J. Bacteriol. 7: 2501-2507.
- Liu, X., Y. Wang, H. Gao & X. Xu. 2011. Identification and characterization of genes encoding two novel LEA proteins in Antarctic and temperate strains of *Chlorella vulgaris*. Gene 482:51–58.
- Lleó, M. del M., S. Pierobon, M. C. Tafi, C. Signoretto & P. Canepari. 2000. mRNA Detection by Reverse Transcription-PCR for Monitoring Viability over Time in an *Enterococcus faecalis* Viable but Nonculturable Population Maintained in a Laboratory Microcosm. Applied and Environmental Microbiology, 66(10):4564-4567.
- López-Reyes L. 1996. Diversidad de los diazotrofos *Klebsiella* y *Azospirillum* asociados a la caña de azúcar. Tesis de posgrado para obtener el título de Maestría en Ciencias Microbiológicas. CICM-ICBUAP.
- Lu, M., B-Y. Xu, K. Zhou, W. Cheng, Y-L- Jiang, Y. Chen & C-Z. Zhou. 2014. Structural and biochemical analyses of *Microcystis aeruginosa* O-acetylserine sulfhydrylases reveal a negative feedback regulation of cysteine biosynthesis. Biochimica et Biophysica Acta, 1844:308-315.
- Lugtenberg, B. & F. Kamilova. 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. Annu. Rev. Microbiol. 63: 541-556.
- Malanga, G., R. G. Kozak, S. Puntarulo. 1999. N-Acetylcysteine-dependent protection against UV-B damage in two photosynthetic organisms. Plant Science, 141:129-137.
- Makarova, K. S., M. V. Omelchenko, E. K. Gaidamakova, V. Y. Matrosova, A. Vasilenko *et al.* 2007. *Deinococcus geothermalis*: The Pool of Extreme Radiation Resistance Genes Shrinks. PLoS ONE, 2(9):e955.
- Manzanera, M., A. García de Castro, A. Tondervik, M. Rayner-Brandes, A. R. Strom, & A. Tunnacliffe. 2002. Hydroxyectoine is superior to trehalose for anhydrobiotic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. Appl. Environ. Microbiol. 68: 4328-4333.
- Margesin, R. & F. Schinner. 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: 650:663.
- Martínez, J., L. Martínez, M. Rosenblueth, J. Silva & E. Martínez-Romero. 2004. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. Int. Microbiol. 7: 261-268.

- Matallana-Surget, S., C. Villette, L. Intertaglia, F. Joux, M. Bourrain & P. Lebaron. 2012. Response to UVP radiation and oxidative stress of marine bacteria isolated from South Pacific Ocean and Mediterranean Sea. *Journal of Biochemistry and Photobiology*, 117:254-261.
- Matsen, J. M., J. A. Spindler & R. O. Blosser. 1974. Characterization of *Klebsiella* isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates. *App. Microbiol.* 28: 672-678.
- Molina, L., C. Ramos, E. Duque, M. C. Ronchel, J. M. García, L. Wyke & J. L. Ramos. 2000. Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil & Biochemistry*, 32:315-321.
- Morales-García, E., E. Duque, O. Rodríguez-Andrade, J. de la Torre, R. D. Marínez-Contreras, R. Pérez-Terrón & J. Muñoz-Rojas. 2010. Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *BioTecnología*. 14(2): 11 - 29.
- Morales-García, Y. E., D. Juárez-Hernández, A. Muñoz-García, A. L. Hernández-Tenorio & J. Muñoz-Rojas. 2011. Efecto de un multiinoculante con especies compatibles sobre maíz (*Zea mays*). *In extenso*. Memoria VII encuentro "Participación de la mujer en la Ciencia". Biotecnología y Ciencias Agropecuarias. ISBN: 978-607-95228-2-7. León, Guanajuato, México.
- Muñoz-Aguilar, J. M., Sabih A. M., Richards A. J. M., Loake G. J., Watson M. D. and Shaw C. H. 1988. Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* towards Flavonoid Inducers of the Symbiotic Nodulation Genes. *J. Gen. Microbiol.* 134:2741-2746.
- Muñoz-Arenas L. C., L. A. Pazos-Rojas, Y. E. Morales-García, C. Toribio-Rosales, M. R. Bustillos-Cristales & J. Muñoz-Rojas. 2006. Supervivencia de *P. putida* KT2440 a condiciones de desecación natural. *In extenso*. Memorias del V encuentro Nacional de Biotecnología-IPN. 50-54. *In*: Durán-Páramo & Salgado-Manjarrez (ed.), Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.
- Muñoz-Arenas L. C. 2011. Estrategias de *Pseudomonas putida* KT2440 para enfrentar el proceso de desecación. Tesis de Posgrado para obtener el título de Maestría en Ciencias Microbiológicas. CICM – ICUAP.
- Muñoz-Rojas, J., P. Bernal, E. Duque, P. Godoy, A. Segura & J. L. Ramos. 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., O. Rodríguez-Andrade, L. A. Pazos-Rojas, M. R. Bustillos-Cristales, A. Corral-Lugo, J. A. Munive & Y. E. Morales-García. 2008. Evaluación de la supervivencia de bacterias benéficas a la desecación ambiental. 4th International Meeting of Biotechnology. Granada, España.
- Narisawa, N., S. Haruta, H. Arai, M. Ishii & Y. Igarashi. 2008. Coexistence of Antibiotic-Producing and Antibiotic-Sensitive Bacteria in Biofilms Is Mediated by Resistant Bacteria. *App. Environ. Microbiol.* 74(12): 3887-3894.
- Nelson, K. E., C. Weinl, I. T. Paulsen, R. J. Dodson, H. Hilbert *et al.*, 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, 4:799-808.
- Oliver, A. E., O. Leprince, W. F. Wolkers, D. K. Hinch, A. G. Heyer & J. H. Crowe. 2010. Non-Disaccharide-Based Mechanisms of Protection during Drying. *Cryobiol.* 43:151-167.
- Oliver, J. D. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *The Journal of Microbiology*, 43(5):93-100.
- Oliver, J. D. 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 34:415-425.
- Ordax, M., E. Marco-Noales, M.M. López & E. G. Biosca. 2006. Survival Strategy of *Erwinia amylovora* against Copper: Induction of the Viable but Nonculturable State. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5):3482-3488.
- Page-Sharp, M. C. A. Behm & G. D. Smith. 1999. Involvement of the compatible solutes trehalose and sucrose in the response to salt stress of a cyanobacterial *Scytonema* species isolated from

- desert soils. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1472:519-528.
- Palma, M., J. Zurita, J. A. Ferreras, S. Worgall, D. H. Larone, L. Shi, F. Campagne & L. E. N. Quadri. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* SoxR Does Not Conform to the Archetypal Paradigm for SoxR-Dependent Regulation of the Bacterial Oxidative Stress Adaptive Response. *Infection and Immunity*. 73(5):2958-2966.
- Park, S. & J. A. Imlay. 2003. High Levels of Intracellular Cysteine Promote Oxidative DNA Damage by Driving the Fenton Reaction. *J. Bacteriol.* 185(6):1942-1950.
- Park, E., S. Peña-Llopis, Y. Lee & B. Demple. 2006. Regulation of superoxide stress in *Pseudomonas putida* KT2440 is different from the SoxR paradigm in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 341:51-56.
- Pazos-Rojas L. A. 2011. Estudios biológicos sobre la desecación de *Pseudomonas putida* KT2440. Tesis de Posgrado para obtener el título de Maestría en Ciencias Microbiológicas. CICM – ICUAP.
- Pedraza-Pérez, Y. 2014. Tesis de doctorado en curso.
- Pleitner, A., Y. Zhai, R. Winter, L. Ruan, L. M. McMullen, M. G. Gänzle. 2012. Compatible solutes contribute to heat resistance and ribosome stability in *Escherichia coli* AW1.7. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1824:1351-1357.
- Poirier, I., L. Kuhn, C. Caplat, P. Hamman & M. Bertrand. 2014. The effect of cold stress on the proteome of the marine bacterium *Pseudomonas fluorescens* BA3SM1 and its ability to cope with metal excess. *Aquatic Toxicology*. 157:120-133.
- Poole, L. B. 2014. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Radic. Biol. Med.* *In press*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.013>.
- Potts, M. 1994. Desiccation Tolerance of Prokaryotes. *Microbiological Reviews*, 58(4):755-805.
- Potts, M. 1999. Mechanisms of desiccation tolerance in Cyanobacteria. *European Journal of Phycology* 34: 319-328.
- Potts M., S. M. Slaughter, F. U. Hunneke, J. F. Garst & R. F. Helm. 2005. Desiccation tolerance of prokaryotes: application of principles to human cells. *Integr. Comp. Biol.* 45: 800-809.
- Ramos J. L., M. T. Gallegos, S. Marqués, M. I. Ramos-González, M. Espinosa-Urgel & A. Segura. 2001. Responses of gram-negative bacteria to certain environmental stressors. *Curr. Opin. Microbiol.* 4: 166-171.
- Ramos, J. L., M. M. González-Pérez, A. Caballero & P. van Dilewijn. 2005. Bioremediation of polynitrated aromatic compounds: plants and microbes put up a fight. *Current Opinion Biotech.* 16:275-281.
- Ramos-Díaz, M. A. & J. L. Ramos. 1998. Combined Physical and Genetic Map of the *Pseudomonas putida* KT2440 Chromosome. *J. Bacteriol.* 180(23): 6352-6363.
- Ramos-González, M., P. Godoy, M. Alaminos, A. Ben-bassat & J. L. Ramos. 2001. Physiological Characterization of *Pseudomonas putida* DOT-T1E Tolerance to p-Hydroxybenzoate. *App. Env. Microbiol.* 67(9): 4338-4341.
- Riley, M.A. and Wertz, J.E. 2002. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie* 84: 357-364.
- Roberson, E. B. & M. K. Firestone. 1992. Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(4):1284-1291.
- Rodríguez-Andrade, O. 2011. Búsqueda de mutantes sensibles a estrés producido por congelación-descongelación y su relación con la desecación-rehidratación, usando como modelo a *Klebsiella variicola* T29A2. Tesis de posgrado para obtener el título de Maestría en Ciencias Microbiológicas. CICM-ICBUAP.
- Rosenblueth, M., L. Martínez, J. Silva & E. Martínez-Romero. 2004. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *System. Appl. Microbiol.* 27: 27 – 35.

- Roxas, V. P., S.A. Lodhi, D.K. Garrett, J.R. Mahan & R.D. Allen. 2000. Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase, *Plant Cell Environ.* 41(11):1229–1234.
- Rueda-Puente, E. O., F. A. Beltrán, F. H. Ruíz, R. D. Valdez, J. L. García. N. Y. Ávila, L. Partida & B. Murillo. 2011. Opciones de manejo sostenible del suelo en zonas áridas: Aprovechamiento de la halófito *Salicornia bigelovii* (Torr.) y uso de biofertilizantes en la agricultura moderna. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13:157- 167.
- Santos, H. & M. S. da Costa. 2002. Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments. *Environmental Microbiology*, 4(9):501–509.
- Saum, S. H. & V. Müller. 2008. Regulation of osmoadaptation in the moderate halophile *Halobacillus halophilus*: chloride, glutamate & switching osmolyte strategies. *Saline Systems*, 4:1-15.
- Scherber, C. M., J. L. Schottel & A. Aksan. 2009. Membrane phase behavior of *Escherichia coli* during desiccation, rehydration, and growth recovery. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788:2427-2435.
- Schnoor, M., P. VoB, P. Cullen, T. Böking, H-J. Galla, E. A. Galinski & S. Lorkowski. 2004. Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR enhancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322:867-872.
- Sidoux-Walter, F., N. Pettersson & S. Hohmann. 2004. The *Saccharomyces cerevisiae* aquaporin Aqp1 is involved in sporulation. *PNAS*, 101(50): 17422-17427.
- Signoretto, C., M. del M. Lleó, M. C. Tafi & P. Canepari. 2000. Cell Wall Chemical Composition of *Enterococcus faecalis* in the Viable but Nonculturable State. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5):1953-1959.
- Silvana, M., R. C. da Silva, A. C. Dias de Castro, L. W. Riley & B. Meurer. 2006. Identification of Clinical Isolates of Indole-Positive and Indole-Negative *Klebsiella* spp. *J. Clinical Microbiol.* 44: 3640-3646.
- Smirnova, G.V. & O. N. Oktyabrsky. 2005. Glutathione in bacteria. *Biochemistry*. 70:1199-1211.
- Smirnova, G., N. Muzyka & O. Oktyabrsky. 2012. Transmembrane glutathione cycling in growing *Escherichia coli* cells. *Microbiological Research*, 167:166-172.
- Spector, A. P. & W. J. Kenyon. 2012. Resistance and survival strategies of *Salmonella* entérica to environmental stresses. *Food Research International*, 45:455-481.
- Steels, E. L., R. P. Learmonth & K. Watson. 1994. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiol.* 140:569-576.
- Stjepandic, D., C. Weinel, H. Hilbert, H. L. Koo, F. Diehl, K. Nelson, B. Tümmeler & J. Hoheisel. 2002. The genome structure of *Pseudomonas putida*: high-resolution mapping and microarray analysis. *Env. Microbiol.* 4(12): 819 – 823.
- Sun, W. Q. & A. C. Leopold. 1997. Cytoplasmic Vitrification and Survival of Anhydrobiotic Organisms. *Comp. Biochem. Physiol.* 117A(3):327–333.
- Sugawara, M., E. J. Cytryn & M. J. Sadowsky. 2010. Functional Role of Bradyrhizobium japonicum Trehalose Biosynthesis and Metabolism Genes during Physiological Stress and Nodulation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(4):1071–1081.
- Swamy, M. & A. Kumar. 2013. Genomics-based precision breeding approaches to improve drought tolerance in rice. *Biotechnology Advances* 31:1308–1318.
- Tamaru, Y., Y. Takani, T. Yoshida & T. Sakamoto. 2005. Crucial Role of Extracellular Polysaccharides in Desiccation and Freezing Tolerance in the Terrestrial Cyanobacterium *Nostoc commune*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11):7327-7333.
- Tanghe, A. R. Van Dijck & J. M. Thevelein. 2006. Why do microorganisms have aquaporins? *Trends in Microbiology*, 14(2):78-85.
- Timmis, K. N. 2002. *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Env. Microbiol.* 4(12): 779 - 781.

- Toldi, O., Z. Tuba & P. Scott. 2009. Vegetative desiccation tolerance: Is it a goldmine for bioengineering crops? *Plant Science*, 176:187-199.
- Turnbull, A. L. & M. G. Surette. 2008. L-Cysteine is required for induced antibiotic resistance in actively swarming *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*, 154:3410-3419.
- Turnbull, A. L. & M. G. Surette. 2010. Cysteine biosynthesis, oxidative stress and antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium*. *Research in Microbiology*, 161:643-650.
- Turrent-Fernández, A. 2008. Actualización de la producción sustentable de granos en México. In: Ruiz-Torres, N. A. & R. H. Lira-Saldivar. 2008. *Tecnologías Sustentables en Semillas*. Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas. Saltillo, Coahuila.
- Uhlívorá, 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.
- Vanderlinde, E. M., J. J. Harrison, A. Muszynski, R. W. Carlson, R. J. Turner & C. K. Yost. 2010. Identification of a novel ABC transporter required for desiccation tolerance, and biofilm formation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841. *FEMS Microbiol. Ecol.* 71(3):327-340.
- Van de Mortel, M. & L. J. Halverson. 2004. Cell envelope components contributing to biofilm growth and survival of *Pseudomonas putida* in low-water-content habitats. *Molecular Microbiology* (2004) 52(3), 735–750.
- Vattakaven, T., P. Bond, G. Bradley & C. B. Munn. 2006. Differential Effects of Temperature and Starvation on Induction of the Viable-but-Nonculturable State in the Coral Pathogens *Vibrio shiloi* and *Vibrio tasmaniensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10):6508-6513.
- Venturi, V. & C. Fuqua. 2013. Chemical Signaling Between Plants and Plant-Pathogenic Bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51:17-37.
- Vergauwen, B., F. Pauwels, J. J. Van Beeumen. 2003. Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against respiration-generated hydrogen peroxide in *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* 185:5555-5562.
- Vilchez, S. & M. Manzanera. 2011. Biotechnological uses of desiccation-tolerant microorganisms for the rhizoremediation of soils subjected to seasonal drought. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91: 1297 – 1304.
- Vriezen, J. A. C., F. J. de Bruijn & K. Nüsslein. 2007. Responses of Rhizobia to Desiccation in Relation to Osmotic Stress, Oxygen, and Temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(11):3451-3459.
- Warner, D. F. 2010. The role of DNA repair in *M. tuberculosis* pathogenesis. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms – Mycobacterial infections*, 7(1):e5-e11.
- Wong, & Liu. 2008. Characterization of the Low-Salinity Stress in *Vibrio vulnificus*. *Journal of Food Protection*, 71(3):23-26.
- Wong, H. C., & P. Wang. 2004. Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *J. Appl. Microbiol.* 96, 359–366.
- Yoshida, T. & T. Sakamoto. 2009. Water-stress induced trehalose accumulation and control of trehalase in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* IAM M-15. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 55: 135-145.
- Yoshimura, H., S. Okamoto, Y. Tsumuraya & M. Ohmori. 2007. Group 3 sigma factor gene, *sigJ*, a key regulator of desiccation tolerance, regulates the synthesis of extracellular polysaccharide in cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Research*, 14:13-24.
- Zhang J., G. C. Du, Y. Zhang, X. Y. Liao, M. Wang, Y. Li, & J. Chen. 2010. Glutathione protects *Lactobacillus sanfranciscensis* against freeze-thawing, freeze-drying and cold treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 9: 2989-2996.
- Zhao, C., Y. Moriga, B. Feng, Y. Kumada, H. Imanaka, K. Immamura & K. Nakanishi. 2006. On the interaction site of serine acetyltransferase in the cysteine synthase complex from *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 341:911-916.

Zhao, Y., L. A. Hindorff, A. Chuang, M. Monroe-Augustus, M. Lyrstis, M. L. Harrison, F. B. Rudolph & G. N. Bennett. 2003. Expression of a Cloned Cyclopropane Fatty Acid Synthase Gene Reduces Solvent Formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5):2831-284.

ANEXO 1

Pruebas de crecimiento en diferentes medios de cultivo para la identificación de medios selectivos para los modelos de estudio *P. putida* KT2440 y *K. variicola* T29A2, así como para otras bacterias utilizadas en el LEMM.

	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Klebsiella varicola</i>	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>Burkholderia sacchari</i>	<i>Burkholderia unamae</i>
BAC	+	+	+	+	+	+
LB	++	++	++	+	+	+
Rojo Congo	+	+	+	+	+	+
MacConkey	++	++	++	-	-	-
LB Cm80	++	++	++	+	+	+
µg Citrato de Simon	++	+	+	-	-	+
Cm80µg Citrato de Simons	++	-	-	-	-	-
Cm150µg Sal-manitol	-	+	+	-	-	-
Sal-manitol 50%	-	++	++	-	-	-
Sal 50%	-	++	++	-	-	-
Manitol 50%	-	-	+	-	-	-
Dextrosa Sabouraud	+	+	++	-	++	++
LGI	+	+	+	+	+	+
LGI Cm100 µg Medio mínimo	+	+	+	-	+	++
Sacarosa	+	+	+	+	+	+
D-Glucosa	+	+	+	+	+	+
Myo-Inositol	+	+	+	+	+	+
Fructosa	+	+	+	+	+	+
Xilosa	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	-	+	+
TESMA						
pH 5	-	-	-	-	-	-
pH 6	-	-	+	-	-	+
pH 6.7	+	+	+	+	+	+
pH 7	+	+	+	+	+	+
pH 8	+	+	+	+	+	+
pH 9	+	+	+	+	-	-
pH 10	+	+	+	+	-	-

	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Klebsiella varicola</i>	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>Burkholderia sacchari</i>	<i>Burkholderia unamae</i>
LB						
pHi 5	-	-	-	-	-	-
pHi 6	-	+	+	-	-	+
pHi 8	+	+	+	+	-	-
pHi 9	+	+	+	+	-	-
pHi 10	+	+	+	-	-	-
LB - PbCl ₂						
0.25 mM	+	+	+	-	-	-
0.5 mM	+	+	+	-	-	-
1 mM	+	+	+	-	-	-
2 mM	-	+	+	-	-	-
LB - CuSO ₄						
0.25 mM	++	++	++	+	-	-
0.5 mM	++	++	++	-	-	-
1 mM	++	++	++	-	-	-
2 mM	++	++	++	-	-	-
4 mM	+	+	+	-	-	-
LB - ZnSO ₄						
0.25 mM	++	++	++	+	-	-
0.5 mM	++	++	++	-	-	-
1 mM	++	++	++	-	-	-
2 mM	++	++	++	-	-	-
LB - C ₆ H ₅ COONa						
0.25 mM	+	+	+	-	-	-
0.5 mM	+	+	+	-	-	-
1 mM	++	++	++	-	-	-
2 mM	++	++	+	-	-	-
4 mM	+	+	-	-	-	-
LB - CoCl ₂						
0.25 mM	+	+	+	+	-	-
0.5 mM	+	+	+	-	-	-
1 mM	-	+	+	-	-	-
Dicloxacilina						
30 µg	++	++	++	-	-	-
50 µg	++	++	++	-	-	-
Kanamicina (Km)						
30 µg	-	-	-	-	-	-
50 µg	-	-	-	-	-	-
100 µg	-	-	-	-	-	-

	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Klebsiella varicola</i>	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>Burkholderia sacchari</i>	<i>Burkholderia unamae</i>
Eritromicina						
30 µg	++	++	++	+	+	+
50 µg	++	++	++	+	+	+
100 µg	++	++	++	-	-	+
Cefalaxina (CTX)						
30 µg	-	+	-	-	-	-
50 µg	-	-	-	-	-	-
100 µg	-	-	-	-	-	-
Gentamicina (Ge)						
30 µg	-	-	-	-	-	-
50 µg	-	-	-	-	-	-
100 µg	-	-	-	-	-	-
Amicacina (Ak)						
30 µg	-	-	-	-	-	-
50 µg	-	-	-	-	-	-
100 µg	-	-	-	-	-	-
Cetrazona (Cro)						
30 µg	-	-	-	+	-	-
50 µg	-	-	-	+	-	-
100 µg	-	-	-	+	-	-
Tetraciclina (Te)						
30 µg	++	++	-	-	-	-
50 µg	-	-	-	-	-	-
100 µg	-	-	-	-	-	-

ANEXO 2

Participación en congresos

