



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS
POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**

**DISEÑO DE INOCULANTES BACTERIANOS EN POLVO USANDO UNA MEZCLA
DE TREHALOSA / MYO-INOSITOL COMO PROTECTORES**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRIA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)**

**PRESENTA:
BIOL. MARÍA MONSERRAT CAPILLA OTERO**

**ASESOR DE TESIS:
D.C. JESÚS MUÑOZ ROJAS**

**CO-ASESOR:
D.C. YOLANDA MORALES GARCÍA**

Febrero 2026



BUAP

Puebla, Pue. a 23 de enero 2026.

**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 alumna **María Monserrat Capilla Otero**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

"Diseño de inoculantes bacterianos en polvo usando una mezcla de trehalosa/myo-inositol como protectores"

A nuestro juicio, la alumna **María Monserrat Capilla Otero** puede proceder a la digitalización 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. Antonino Báez Rogelio



D.C. Dalia Molina Romero

D.C. Verónica Quintero Hernández

D.C. María del Rocío Bustillos Cristales

Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

INDICE

Índice de tablas.....	4
Índice de figuras.....	5
Abreviaturas.....	7
Resumen	8
Introducción.....	10
Bacterias rizosféricas promotoras del crecimiento de plantas.....	11
Los inoculantes microbianos	13
Antecedentes.....	¡Error! Marcador no definido.
Métodos de conservación de organismos.....	15
Liofilización como método de conservación	17
Lio-protectores	19
Trehalosa	19
Myo-inositol	20
<i>P. putida</i> KT2440 y su respuesta al estrés por desecación.....	20
Justificación	24
Hipótesis	25
Objetivo general.....	25
Objetivos particulares.....	25
Metodología	26
Medio de cultivo	26
Condiciones de liofilización y determinación de número de células viables.	26
Evaluación del daño a la membrana de <i>P. putida</i> KT2440.....	28
Resultados.....	29
Supervivencia a largo plazo de <i>P. putida</i> KT2440 en presencia de trehalosa y myo-inositol monitoreada a los 20 minutos y 24 horas después de la hidratación.	29
Efecto de trehalosa y myo-inositol en la integridad de la membrana de <i>P. putida</i> KT2440 tras liofilización	33
Discusión	40
Conclusiones.	44
Perspectivas	45
Bibliografía.....	45

Índice de tablas

Tabla 1. Ejemplos de métodos de preservación de microorganismos según el tiempo de viabilidad.

Tabla 2. Protectores usados en este trabajo que se adicionaron a las células de *Pseudomonas putida* KT2440 antes del proceso de liofilización.

Tabla 3. Supervivencia de *P. putida* KT2440 en liofilizados rehidratados durante 20 minutos

Tabla 4. Supervivencia de *P. putida* KT2440 en liofilizados rehidratados durante 24 horas.

Índice de figuras

Figura 1. Ejemplos de mecanismos que las PGPR llevan a cabo para promover el crecimiento o potenciar la salud de las plantas.

Figura 2. Ejemplos de inoculantes microbianos desde el punto de vista de la función del microorganismo que contienen o de la forma física que el acarreador permite a la formulación.

Figura 3. Componentes principales de un liofilizador.

Figura 4. Molécula de trehalosa elaborada mediante el modelo de cuñas. Los átomos de carbono se representan con los círculos rojos.

Figura 5. Molécula de myo-inositol elaborada mediante el modelo de cuñas. Los átomos de carbono se representan con los círculos rojos.

Figura 6. Ejemplos de lioprotectores que se han explorado para proteger a *Pseudomonas putida* KT2440 del proceso de liofilización y resguardo en condiciones de vacío. Los datos fueron tomados de Muñoz-Rojas et al., 2006. BSR significa tasa de supervivencia bacteriana y es la relación del (Log No. UFC/mL después de la liofilización + 1) dividido entre el (Log No. UFC/mL antes de la liofilización); cuyo resultado de la relación se multiplica por 100. La concentración explorada de los compuestos explorados como lioprotectores fue de 200 mM. Para leche descremada, se usó una suspensión al 20%.

Figura 7. Clasificación de la tolerancia a la desecación de bacterias usando colores, en acuerdo a Pazos-Rojas et al., 2018.

Figura 8. Recuperación de *P. putida* KT2440 en medio LB (Luria-Bertani) monitoreada antes y después de la liofilización, así como durante su resguardo. Se realizó monitoreo durante 66 días posteriores a la liofilización (DPL), evaluando la viabilidad bacteriana durante hidratación corta (20 minutos) e hidratación prolongada (24 horas), por el método de goteo en placa por sellado masivo (MGPSM). A) Muestras fotografiadas de *P. putida* KT2440 antes de la liofilización b) 3 días posteriores a la liofilización, c) 12 días posteriores a la liofilización d) 66 días posteriores a la liofilización.

Figura 9. Representación gráfica de la tasa de supervivencia bacteriana de *P. putida* KT2440 a los 20 minutos tras la hidratación, monitoreada durante 66 días después de la liofilización. Los valores representan la media $\pm$ desviación estándar (n=5) por cada tratamiento. (a) AL significa antes de la liofilización. b) DPL significa días posteriores a la liofilización.

Figura 10. Representación gráfica de la tasa de supervivencia bacteriana de *P. putida* KT2440 a las 24 horas tras la hidratación, monitoreada durante 66 días después de la liofilización. Los valores representan la media $\pm$ desviación estándar (n=5) por cada tratamiento. (a) AL significa antes de la liofilización b) DPL significa días posteriores a la liofilización.

Figura 11. Micrografías de fluorescencia de *P. putida* KT2440 teñidas con el kit LIVE/DEAD BacLight evaluadas antes de ser sometidas a liofilización. Las imágenes muestran células vivas (verde, tinción con SYTO9) y células con daño en la membrana

(rojo, tinción con yoduro de propidio). Las letras (A–C) Control sin protector, (D–F) Trehalosa y Myo-inositol 100 mM, (G–I) Trehalosa y Myo-inositol 200 mM, (J–L) Myo-inositol 200 mM y (M–Ñ) Trehalosa 200 mM. En cada grupo de tres paneles: la primera imagen corresponde a la tinción con SYTO9, la segunda al yoduro de propidio, y la tercera a la fusión (merge) de ambas señales.

Figura 12. Micrografías de fluorescencia de *P. putida* KT2440 teñidas con el kit LIVE/DEAD BacLight. Las observaciones se realizaron a los 20 minutos de rehidratación, 12 días posteriores a la liofilización. Las imágenes muestran células vivas (verde, tinción con SYTO9) y células con daño en la membrana (rojo, tinción con yoduro de propidio). Las letras (A–C) Control sin protector, (D–F) Trehalosa y Myo-inositol 100 mM, (G–I) Trehalosa y Myo-inositol 200 mM, (J–L) Myo-inositol 200 mM y (M–Ñ) Trehalosa 200 mM. En cada grupo de tres paneles: la primera imagen corresponde a la tinción con SYTO9, la segunda al yoduro de propidio, y la tercera a la fusión (merge) de ambas señales.

Figura 13. Micrografías de fluorescencia de *P. putida* KT2440 teñidas con el kit LIVE/DEAD BacLight. Las observaciones se realizaron a los 24 horas después de la rehidratación, 12 días posteriores a la liofilización. Las imágenes muestran células vivas (verde, tinción con SYTO9) y células con daño en la membrana (rojo, tinción con yoduro de propidio). Las letras (A–C) Control sin protector, (D–F) Trehalosa y Myo-inositol 100 mM, (G–I) Trehalosa y Myo-inositol 200 mM, (J–L) Myo-inositol 200 mM y (M–Ñ) Trehalosa 200 mM. En cada grupo de tres paneles: la primera imagen corresponde a la tinción con SYTO9, la segunda al yoduro de propidio, y la tercera a la fusión (merge) de ambas señales.

Figura 14. Micrografías de fluorescencia de *P. putida* KT2440 teñidas con el kit LIVE/DEAD BacLight. Las observaciones se realizaron a los 20 minutos después de la rehidratación, 66 días posteriores a la liofilización. Las imágenes muestran células vivas (verde, tinción con SYTO9) y células con daño en la membrana (rojo, tinción con yoduro de propidio). Las letras (A–C) Control sin protector, (D–F) Trehalosa y Myo-inositol 100 mM, (G–I) Trehalosa y Myo-inositol 200 mM, (J–L) Myo-inositol 200 mM y (M–Ñ) Trehalosa 200 mM. En cada grupo de tres paneles: la primera imagen corresponde a la tinción con SYTO9, la segunda al yoduro de propidio, y la tercera a la fusión (merge) de ambas señales.

Abreviaturas

AL: antes de la liofilización

BSR: tasa de supervivencia bacteriana

Cm: cloranfenicol

°C: grados Celcius

DDP: días después de la liofilización

DO: densidad óptica

rpm: revoluciones por minuto

H: horas

HR: humedad relativa

mL: mililitros

μL: microlitros

μg: microgramos

Resumen

La liofilización es un proceso de deshidratación usado para preservar, conservar y almacenar un microorganismo de interés farmacéutico, biotecnológico y alimenticio. Durante la liofilización, el agua de la muestra sufre un proceso de sublimación en un entorno de vacío (sólido a gas), y el producto obtenido es un polvo de estructura porosa, con cierta avidez por el agua, permitiendo que el producto pueda ser reconstituido de forma rápida e íntegra. La supervivencia de células bacterianas se ha evaluado bajo condiciones de liofilización, observando que sobreviven en presencia de protectores, sin embargo, la supervivencia es variable y no se ha encontrado un protector universal.

Actualmente los inoculantes de segunda generación que promueven el crecimiento de plantas y mejoran el rendimiento de cultivos, se encuentran en forma de presentación líquida y una desventaja que presentan estos inoculantes es que requieren de refrigeración para mantener su viabilidad, lo cual incrementa los costos durante el almacenamiento y envío. Por lo que formular inoculantes en forma de polvo podría ser una opción para reducir esos costos. Al respecto, en un trabajo previo de nuestro grupo se demostró que la mezcla trehalosa/myo-inositol confiere protección a *Pseudomonas putida* KT2440 frente al proceso de liofilización, manteniendo su viabilidad hasta 12 días después del tratamiento, aun cuando las muestras fueron almacenadas sin vacío, a 30 °C y 50 % de humedad relativa. No obstante, aún se desconoce si esta formulación es capaz de proporcionar protección a tiempos de almacenamiento más prolongados bajo estas mismas condiciones.

En este proyecto el objetivo fue evaluar la tasa de supervivencia bacteriana (BSR) de *P. putida* KT2440 tras el proceso de liofilización y durante el almacenamiento (sin vacío) a un tiempo de aproximadamente 2 meses; usando como protectores una mezcla de trehalosa/myo-inositol en distintas concentraciones. Se realizaron monitoreos de supervivencia cada tres días después de la liofilización, en las primeras etapas, y posteriormente cada dos semanas hasta finalizar los 66 días. Se evaluaron dos tiempos de rehidratación (20 minutos y 24 horas posteriores a la rehidratación) para evaluar la recuperación celular. Además, con el fin de analizar el posible daño en la membrana celular, las muestras fueron teñidas con el kit Live/Dead BacLight, permitiendo distinguir entre células viables y no viables en los distintos tratamientos y tiempos de análisis.

Los resultados mostraron que la combinación de trehalosa y myo-inositol a 100 mM y 200 mM respectivamente permitió una tasa de supervivencia bacteriana (BSR; por sus siglas en inglés) catalogada como altamente tolerante (BSR >80%) durante los primeros nueve días posteriores a la liofilización. Este efecto se conservó con la concentración de trehalosa y myo-inositol a 200 mM hasta el día 15. Entre los 18 y 54 días posteriores a la liofilización, las células tratadas con la mezcla de protectores mantuvieron una BSR catalogada como tolerante ($60 < \text{BSR} \leq 80$), mientras que hacia el día 66 la supervivencia disminuyó a niveles de baja tolerancia para ambos tratamientos de trehalosa y myo-inositol (100 mM y 200 mM). Los tratamientos con trehalosa a 200 mM y con la combinación de trehalosa y myo-inositol a 100 mM mostraron una recuperación significativa 24 h después de la rehidratación, alcanzando nuevamente valores de BSR compatibles con una condición tolerante. Estos resultados sugieren que ambos

tratamientos confieren un efecto protector sostenido que favorece la reactivación celular tras el proceso de rehidratación. El grupo control (sin protector), no presentó crecimiento bacteriano a los 3 días después de la liofilización y el tratamiento con myo-inositol 200 mM mostró células cultivables hasta los 6 días posteriores a la liofilización.

Las observaciones de daño a la membrana con el kit Live/Dead BacLight mostraron que antes de la liofilización, las células bacterianas de *P. putida* KT2440 presentaban membranas integrales, evidenciadas por la fluorescencia verde presentes en el campo evaluado. A los 12 días posteriores a la liofilización, los tratamientos con trehalosa 200 mM y la combinación de trehalosa y myo-inositol a 100 mM y 200 mM mantuvieron una integridad parcial en la membrana. Por el contrario, el grupo control y myo-inositol 200 mM mostraron un daño total en la membrana, ya que el campo presente evidenciaba solo fluorescencia roja. Estos resultados muestran que la trehalosa 200 mM y la mezcla trehalosa con myo-inositol protegen a *P. putida* KT2440 frente al daño estructural inducido por la liofilización y durante los procesos de rehidratación a los 66 días de almacenamiento.

Introducción

Las prácticas agrícolas sostenibles se han convertido en una de las principales preocupaciones ambientales actuales, ya que la agricultura tradicional depende en gran medida del uso de fertilizantes y pesticidas sintéticos (Tilman et al., 2011). El uso prolongado e inadecuado de fertilizantes, junto con la falta de fertilización orgánica y las deficientes prácticas de rotación de cultivos, afecta negativamente la salud del suelo y como consecuencia altera las poblaciones microbianas y en última instancia, disminuye la calidad y cantidad del rendimiento agrícola (Figiel et al., 2025). Este uso excesivo de fertilizantes altera la capacidad del suelo para retener agua generando desequilibrios nutricionales (Fouda et al., 2015). Además, durante la producción de estos insumos se liberan gases contaminantes como amoníaco, dióxido de carbono y metano, los cuales contribuyen al cambio climático. De manera adicional, los desechos industriales generados en su fabricación pueden contaminar cuerpos de agua y favorecer procesos de eutrofización, lo que provoca la disminución del oxígeno disuelto y una pérdida significativa de la biodiversidad acuática. A largo plazo, estos fertilizantes degradan la calidad y sostenibilidad del suelo (Yang et al., 2024).

Los sistemas de producción contemporáneos generan que la mayoría de los cultivos, tengan una demanda muy exigente en fertilizantes (Naqqash et al., 2016). Los fertilizantes químicos que contienen en su fórmula química, nitrógeno, fósforo y potasio se aplican excesivamente para poder proporcionar el requerimiento nutrimental a las plantas con el fin de poder incrementar la productividad agrícola (Santoyo et al., 2012). Sin embargo, solo una cantidad limitada (30-40%) de estos nutrientes es absorbida por las plantas debido a la baja eficiencia en el uso de fertilizantes y el resto se pierde en el suelo causando contaminación ambiental (Zhang et al., 2021).

La búsqueda y aplicación de tecnologías innovadoras, adecuadas y respetuosas que no involucren los riesgos al medio ambiente y sobre todo que contribuyan a mejorar la fertilidad del suelo y el crecimiento de las plantas se ha vuelto de gran interés en los últimos años (Fasusi et al., 2021; Ribeiro & Cardoso, 2011). Por esta razón se sugiere que se usen tecnologías más limpias con el fin de disminuir la contaminación del planeta; como por ejemplo el uso de bacterias benéficas (Pazos-Rojas et al., 2016).

Bacterias rizosféricas promotoras del crecimiento de plantas

Las rizobacterias son microorganismos del suelo que pueden colonizar eficientemente la superficie del sistema radicular de la planta y en algunas ocasiones el tejido dentro de la raíz (Sharma et al., 2023). Esta característica de colonización desempeña una función importante en la promoción del crecimiento y la salud de las plantas a través de varios mecanismos, lo que las convierte en un componente clave de la agricultura sostenible (Yang et al., 2022; Yang et al., 2024b). En particular las bacterias rizosféricas son las que colonizan el suelo adyacente a las plantas influenciado por los exudados de sus raíces (Wankhade et al., 2025).

La aplicación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR; por sus siglas en inglés) se ha considerado uno de los métodos para mantener o reducir el impacto negativo hacia el ambiente; ya que ellas pueden promover el crecimiento de las plantas directamente al mejorar la adquisición de nutrientes y producir hormonas mediadoras del crecimiento (fitohormonas) o indirectamente al proteger a las plantas de patógenos (estrés biótico) y mitigar el estrés abiótico (como la sequía y la salinidad) (Yang et al., 2023).

Para la selección de bacterias beneficiosas destinadas a la formulación de biofertilizantes, es fundamental considerar criterios que garanticen su eficacia y seguridad. En este contexto, los microorganismos aislados de la rizosfera se evalúan en función de sus características promotoras del crecimiento vegetal. (Andreozzi et al., 2019; Pandey et al., 2019). Para ello, primero debe explorarse la habilidad para adherirse o colonizar la rizosfera de la planta y posteriormente demostrar que estas bacterias tienen la capacidad de estimular el crecimiento a través de ensayos en cámaras de plantas o en condiciones de invernadero y como objetivo primordial superar el crecimiento de las plantas que no han sido inoculadas por alguna PGPR (Morales-García et al., 2012; Vivanco-Calixto et al., 2016). Como característica adicional una bacteria benéfica no debe ser patógena para las plantas, ni tampoco para los humanos (El-Saadony et al., 2022).

El uso de PGPR es un método eficaz para aumentar el volumen del rendimiento de los cultivos agrícolas (Sharma et al., 2023). La estimulación del crecimiento por PGPR puede ocurrir mediante mecanismos indirectos o directos o una combinación de ambos (Figura 1) (Parray et al., 2016). Los mecanismos directos ocurren cuando las bacterias sintetizan metabolitos que facilitan o aumentan la disponibilidad de elementos nutricionales, necesarios para su metabolismo y proceso nutricional (Gómez-Luna et al., 2012). Estos mecanismos abarcan procesos como la solubilización de fosfatos, la fijación de nitrógeno atmosférico, la síntesis de fitohormonas como auxinas, citoquininas y giberelinas entre otros (Esquivel-Cote et al., 2013). Gracias a estas funciones metabólicas, las PGPR no solo favorecen el crecimiento vegetal en

condiciones normales, sino que también contribuyen a mejorar la tolerancia de las plantas ante diversos tipos de estrés abiótico, como la salinidad (Mahmood et al., 2016; Sahoo et al., 2014), la presencia de metales pesados (Sahoo et al., 2021) o las variaciones de temperatura (Molina-Romero et al., 2017).

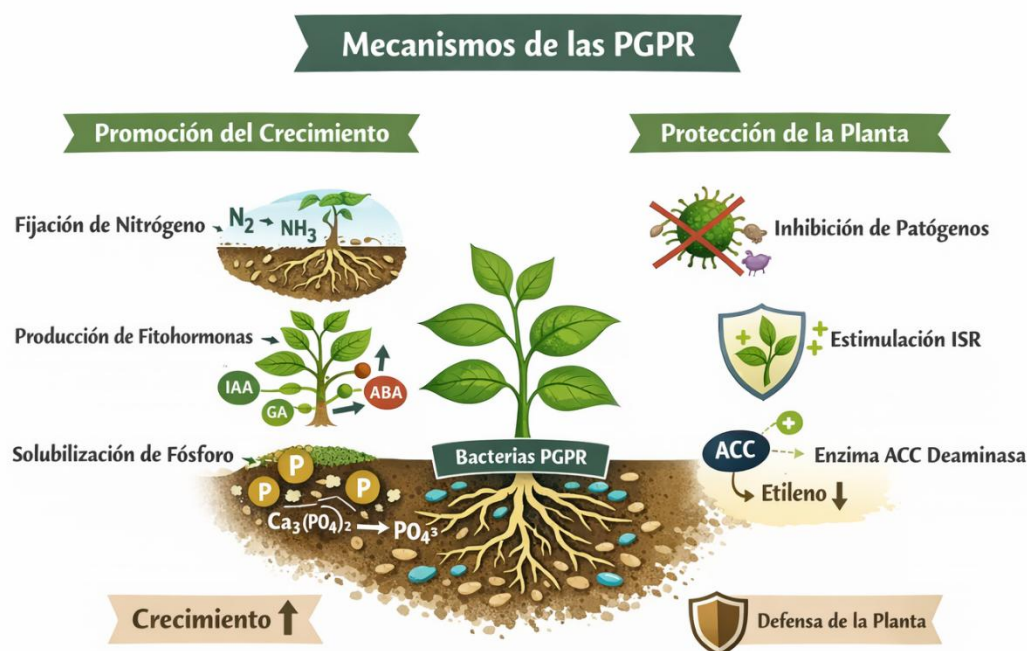


Figura 1. Ejemplos de mecanismos que las PGPR llevan a cabo para promover el crecimiento o potenciar la salud de las plantas. Figura realizada con la ayuda de ChatGPT y descripción propia.

Por otra parte, existe otro tipo de mecanismos que no están directamente relacionado con promoción de crecimiento, sino que su efecto es proteger a las plantas contra ciertos fitopatógenos, a través de la producción de antibióticos y enzimas que inhiben la síntesis de pared celular (Molina-Romero et al., 2015). Estos mecanismos abarcan la producción de sideróforos. Estas son moléculas pequeñas producidas por algunas bacterias bajo condiciones limitantes de hierro (Fe) y actúan como quelantes que secuestran al hierro y contribuyen a mejorar la disponibilidad de este nutriente, así como limitar el crecimiento de ciertos patógenos del suelo (Esquivel-Cote et al., 2013).

Hay otras PGPR que son capaces de excretar metabolitos secundarios antifúngicos y sustancias antibióticas las cuales desplazan a bacterias y hongos de la rizosfera de las plantas (Muñoz, 2017).

La inoculación de plantas con PGPR dentro de los cultivos mejora la productividad y el rendimiento agrícola, ya que estos microorganismos pueden estimular el crecimiento, la

germinación de las semillas, además pueden incrementar la producción de pigmentos, la capacidad fotosintética, así como reducir la volatilización del amoníaco y aumentar la recuperación de nitrógeno, entre otros beneficios (Zhang et al., 2024). Sin embargo, para que estos efectos se traduzcan en beneficios reales en campo, el desarrollo de inoculantes debe considerar diversos aspectos tanto técnicos como económicos. Por ejemplo, el fabricante busca obtener el mayor margen de beneficio sin comprometer la calidad del producto, mientras que los agricultores tienen como meta principal el rendimiento de los cultivos (Rojas-Sánchez et al., 2022).

Los inoculantes microbianos

Un inoculante microbiano es una formulación que contiene un microorganismo benéfico en un acarreador; cuya función del acarreador es la de transportar al microorganismo en forma viable y números elevados desde el laboratorio donde se produce hasta el campo donde es aplicado (Reis et al., 2024). En función del tipo de microorganismos benéficos que transportan, los inoculantes se pueden clasificar en biofertilizantes (inoculantes que contienen fijadores de nitrógeno), fitoestimulantes (contienen microorganismos que producen fitohormonas), biosolubilizantes (microorganismos solubilizadores de elementos contenidos en roca), biocontrolantes (contiene microorganismos que inhiben el crecimiento de patógenos), entre otros (Kumari et al., 2022) (Figura 2).

La búsqueda de creación de inoculantes microbianos no solo prioriza la promoción del crecimiento, sino que tengan una facilidad de aplicación, la determinación de vida útil (células viables y activas), la formulación, la biomasa y sobre todo la seguridad humana, animal y vegetal (Bashan et al., 2013; O’Callaghan et al., 2022).

En términos generales, un inoculante bacteriano que ha sido adecuadamente producido, formulado y aplicado debe garantizar que el producto utilizado en el sector agrícola proporcione los beneficios esperados. No obstante, en el mercado existen productos de baja calidad e incluso inoculantes contaminados, consecuencia de una formulación o manejo inadecuado (He et al., 2015; Martínez-Álvarez et al., 2016; Oliveira et al., 2017).

Uno de los principales desafíos asociados a los inoculantes bacterianos es mantener su estabilidad durante el almacenamiento prolongado, asegurando al mismo tiempo una cantidad suficiente de células viables a lo largo de este periodo (Berninger et al., 2018). Además, las bacterias inoculadas al ser aplicadas en el campo agrícola deben competir contra ciertos caracteres: depredación de microfauna o condiciones ambientales (Berninger et al., 2016).



Figura 2. Ejemplos de inoculantes microbianos desde el punto de vista de la función del microorganismo que contienen o de la forma física que el acarreador permite a la formulación. Figura realizada con la ayuda de ChatGPT y descripción propia.

El propósito de los inoculantes bacterianos además de promover el crecimiento vegetal es permitir una mayor supervivencia durante el almacenamiento como en el sitio de aplicación (Oliveira et al., 2017; Berninger et al., 2017; Berger et al., 2018).

Los inoculantes se pueden encontrar en forma líquida (suspensión), sólida (polvo, granular) y pasta (Figura 2) (Vassilev et al., 2020). Las formulaciones líquidas presentan características que ayudan a mantener su viabilidad celular. Generalmente contienen fuente de nutrientes y minerales como caldo de fermentación, así como aditivos sorbitol, glicerol y azúcares como glucosa, sacarosa y trehalosa (Lobo et al., 2018). Por otro lado, para las formulaciones sólidas, el agente biológico se mezcla con ciertos vehículos sólidos como vermiculita, talco, polisacáridos, arcillas y residuos agroindustriales, entre otros (Reis et al., 2024). Las formulaciones sólidas de inoculantes se aplican directamente al suelo y, en comparación con las formulaciones líquidas, presentan una mayor vida útil, además de facilitar su manipulación, almacenamiento y transporte (Florencio et al., 2022;). Estos se obtienen mediante distintos procedimientos, como la desecación, liofilización, secado al vacío, secado por dispersión o métodos de concentración celular (Berninger et al., 2018).

Antecedentes

Preservación de microorganismos como base para estudios de supervivencia en inoculantes microbianos

La preservación de microorganismos se realiza con el objetivo de resguardar cepas microbianas y garantizar su disponibilidad a largo plazo (Morales-García et al 2010). Los estudios sobre preservación constituyen una base fundamental para el desarrollo de formulaciones microbianas estables, ya que permiten comprender cómo mantener la viabilidad celular durante el almacenamiento. Para una preservación adecuada, es necesario considerar factores que aseguren la viabilidad, la pureza y la estabilidad genética de las bacterias. En general, el objetivo principal de los métodos de preservación es permitir el almacenamiento prolongado sin comprometer la supervivencia celular (García & Uruburu, 2001).

Métodos de conservación de organismos

Para resguardar microorganismos de interés, que producen antibióticos, vacunas recombinantes y medicamentos para diversas enfermedades, o algún microorganismo de interés agrícola se utiliza la preservación de microorganismos (Manjana et al., 2016). Estos organismos como bacterias, hongos y agentes virales, se preservan usando diferentes técnicas. Además, la elección del método de conservación depende de varios factores, como el tipo de microorganismo, la duración prevista del almacenamiento y las aplicaciones futuras previstas. (Prakash et al., 2012).

La preservación de microorganismos se puede dividir según el tiempo de viabilidad en corto mediano y largo plazo (tabla 1). Los métodos a corto plazo solo permiten la supervivencia de microorganismos en un lapso de algunos días a semanas, estos métodos incluyen técnicas como refrigeración, subcultivo, sistema de microfluidos (Cappuccino & Sherman, 2014; Stanbury et al., 2016). A mediano plazo las células resguardadas pueden permanecer viables hasta 5 años (Smith & Onions, 1994); aquí ya se usan métodos de resguardo en aceite mineral, glicerol y otros protectores, generalmente con el acompañamiento de congelación a -20 °C (Morgan et al., 2006). A largo plazo, las células mantienen viabilidad por más de 5 años (Wellington et al., 1992); los métodos más usados son la criopreservación a -80 °C, liofilización, encapsulación, electrohilado, electropulverización, Nanopartículas para preservar microorganismos y perenfriamiento, en cualquier caso se acompaña del uso de protectores (Senaratne & Jayaweera, 2024).

Tabla 1. Ejemplos de métodos de preservación de microorganismos según el tiempo de viabilidad.

Microorganismo preservado	Método de preservación	Escala temporal	Tiempo de viabilidad aproximado	Referencia
Bacterias no esporuladas (<i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas</i>)	Refrigeración (4 °C) en medio líquido o agar inclinado	Corto plazo	Días a semanas	Cappuccino & Sherman, 2014
Bacterias no esporuladas	Subcultivos periódicos	Corto plazo	Semanas	Stanbury et al., 2016
Bacterias Gram negativas	Congelación a -20 °C (sin crioprotector)	Corto a mediano	Semanas a pocos meses	Morgan et al., 2006
Rizobios (<i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i>)	Turba esterilizada (inoculantes sólidos)	Mediano plazo	6–24 meses	Deaker et al., 2004
PGPR diversas	Formulación líquida con protectores osmóticos	Mediano plazo	Meses	Bashan et al., 2014
Bacterias y levaduras	Congelación a -80 °C con glicerol (10–25 %)	Mediano a largo	Años (5–10)	Hubálek, 2003
Bacterias y hongos	Liofilización (freeze-drying)	Largo plazo	Décadas	Hubálek, 2003
Bacterias esporuladas (<i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i>)	Almacenamiento en seco (esporas)	Largo plazo	Décadas	Nicholson et al., 2000
Actinobacterias (<i>Streptomyces</i>)	Liofilización o -80 °C con crioprotector	Largo plazo	≥10 años	Wellington et al., 1992
Hongos filamentosos	Aceite mineral sobre agar	Mediano plazo	1–5 años	Smith & Onions, 1994
Hongos filamentosos	Criopreservación en N ₂ líquido (-196 °C)	Largo plazo	Indefinido (teórico)	Ryan et al., 2000
Levaduras (<i>Saccharomyces</i>)	-80 °C con glicerol	Largo plazo	≥10 años	Querol et al., 1992

La preservación de microorganismos es un aspecto de mayor importancia cuando se trabaja en investigación de interés agrícola (Hoefman et al., 2012; Louis et al., 1994). Uno de los métodos más recomendables de almacenamiento a largo plazo se logra mediante las técnicas de liofilización y criopreservación (De paoli, 2005).

En particular, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) requieren condiciones que aseguren su estabilidad fisiológica y su capacidad de colonizar las raíces después de periodos prolongados de conservación (Malusá & Vassilev, 2014).

Liofilización como método de conservación

La liofilización es un método clasificado de largo plazo para preservar, conservar y almacenar un microorganismo de interés farmacéutico, biotecnológico y alimenticio (Morales-García et al., 2010). Como resultado de este proceso, las células bacterianas mantienen su integridad y sobre todo aseguran su estabilidad durante largo periodos de tiempo. Esta característica contribuye a la preservación de sus propiedades fisiológicas, morfológicas y genéticas (Morgan et al., 2006). No obstante, una de las principales desventajas de este método radica en la posible alteración de las actividades fisiológicas y metabólicas intracelulares. Por ejemplo, daño celular y pérdida de viabilidad. Esto genera que los microorganismos presenten efectos en la integridad de la membrana, así como daño mecánico, desnaturalización de proteínas, alteraciones en la dinámica del pH y por último la formación de cristales de hielo (Rodríguez-Andrade et al., 2018). Por esta razón, para mejorar el rendimiento de este proceso y mitigar los efectos ocasionados por la deshidratación excesiva, las células se deben de resuspender en compuestos llamados lioprotectores (Chantorn et al., 2022; Leslie et al., 1995). Los lioprotectores son compuestos que permiten la supervivencia de los microorganismos durante todo el proceso de liofilización y no existe un lioprotector universal que proteja a todos los microorganismos (Morales-García et al., 2010).

Por otro lado, los liofilizadores se conforman de tres componentes principales: una cámara de secado, una bomba de vacío y un condensador (Figura 3). Algunos liofilizadores también cuentan con una fuente de calor (Shukla, 2011). La cámara de secado es el compartimento donde se coloca la muestra previamente congelada; esta debe contar con condiciones herméticas al vacío y un control preciso de la temperatura. La bomba de vacío presente en los liofilizadores tiene como objetivo alcanzar el nivel de vacío deseado (458 mmHg o 0.006 atm) y la fuente de calor proporciona la energía necesaria para la sublimación del hielo. Esta compensa el enfriamiento endotérmico del producto y permite mantener la temperatura del material por debajo de la temperatura de transición vítrea (T_g ; por sus siglas en inglés) y por

último el condensador recolecta el vapor emitido de la muestra durante el proceso de sublimación (Jude et al., 2023).

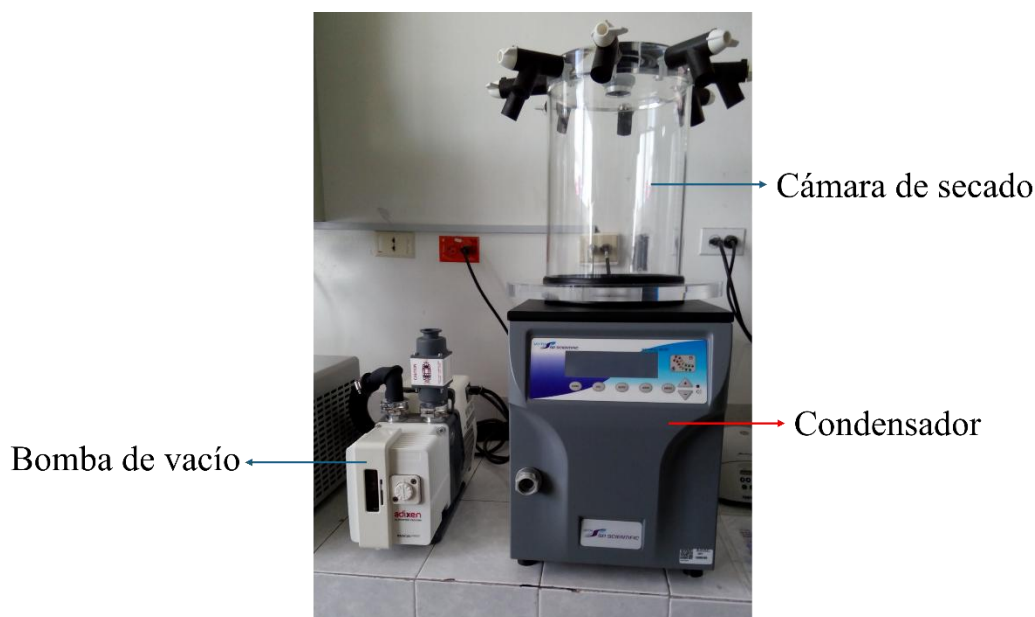


Figura 3. Componentes principales de un liofilizador.

La primera fase de la liofilización consiste en congelar previamente la muestra o producto de interés (Przic et al., 2004). Durante esta etapa, la solución inicial se enfría hasta que el agua solidifica completamente. Posteriormente se realiza el secado, que consta de dos etapas. La primera es el secado primario o sublimación. Esta etapa ocurre bajo condiciones de baja presión y temperaturas por debajo del punto de fusión, típicamente cercanas o inferiores al punto triple del agua ($0.01\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 611 Pa). En este rango, el agua no puede existir en estado líquido, por lo que el hielo pasa directamente a vapor mediante este proceso. Durante esta etapa se elimina aproximadamente un 90 % del total del agua presente en la muestra (agua libre), posteriormente el producto o muestra congelada es calentada bajo condiciones de vacío a través de la reducción de presión (Armijo et al., 2008; Alzamora, 2008; Wessman et al., 2013).

El siguiente paso es la desecación secundaria, esta es la etapa que tiene como objetivo eliminar la humedad residual del producto, que esta unida mediante adsorción dentro del producto, a través del aumento controlado temperatura bajo condiciones de vacío (Armijo et al., 2008; Coulibaly et al., 2018b).

Lioprotectores

Los lioprotectores son medios o sustancias que permiten conservar y almacenar a las células durante el proceso de liofilización, protegiéndolas durante la congelación, el secado y el cambio de presión (Morales-García et al., 2010). Estos pueden clasificarse de acuerdo a su composición química y desempeñan una función y estabilización de proteínas durante el proceso de liofilización. Estas sustancias se clasifican en los siguientes compuestos: monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, aminoácidos, solubilizantes, polisacáridos, surfactantes, iones, aditivos químicos, vidrios poliméricos antiplastificados y mezclas complejas (Hubalek, 2003; Leslie et al., 1995; Morales-García et al., 2010).

Se sabe que los lioprotectores utilizados durante la liofilización ejercen su principal influencia sobre las proteínas, ya que su interacción con ellas es un factor clave para preservar su estabilidad estructural durante el proceso de secado. Protectores como los azúcares (trehalosa y sacarosa) y los polioles (glicerol y sorbitol) pueden formar enlaces de hidrógeno con los grupos polares de las proteínas, sustituyendo parcialmente las moléculas de agua que se pierden durante la desecación y evitando su desnaturalización (Kaushik & Bhat, 2003; Karunnamithy et al., 2024). Además, algunos estudios han demostrado que ciertos lioprotectores del grupo de aminoácidos, como la arginina, pueden actuar como estabilizadores mediante interacciones electrostáticas. Estos compuestos interactúan con los grupos cargados presentes en la superficie de las proteínas, lo que contribuye a mantener su solubilidad y a prevenir la agregación (Arakawa et al., 2006). Sin embargo, aún no se cuenta un lioprotector universal y se debe explorar la supervivencia a la liofilización para cada caso particular (Morgan et al., 2006).

Trehalosa

La trehalosa (α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor formado por dos unidades de glucosa unidas mediante un enlace glicosídico del tipo α,α -1,1 (Figura 4) (Galmarini et al. 2009). Su función principal es proteger los lípidos y proteínas de la membrana celular bacteriana ante situaciones de estrés, como el calor y la congelación (Yoshiyama et al., 2015).

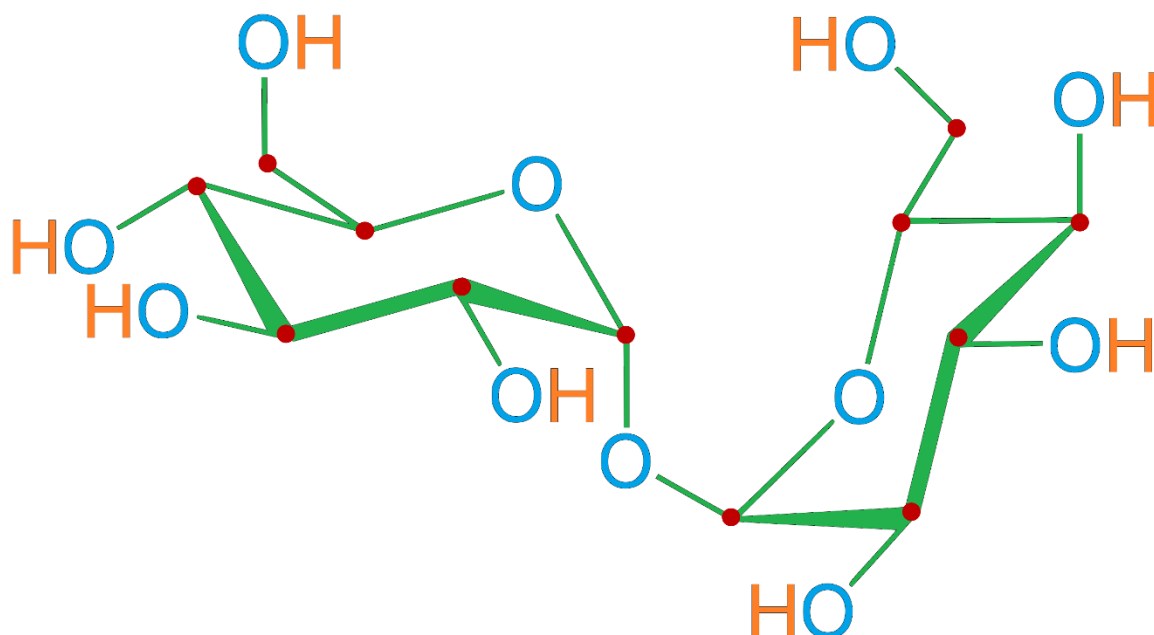


Figura 4. Molécula de trehalosa elaborada mediante el modelo de cuñas. Los átomos de carbono se representan con los círculos rojos.

Myo-inositol

El myo-inositol es un compuesto orgánico de tipo polialcohol (Figura 5); el cual es de gran importancia en la composición de los lípidos de la membrana. Además, se caracteriza por ser una sustancia cristalina y no reductora (Harper, 1980). Desempeña una función fundamental en las respuestas al estrés y en los procesos de desarrollo, es parte de lípidos (fosfatidil inositol), así como es un compuesto soluble clave como precursor de moléculas de señalización (inositol fosfato) (Gillaspy, 2011). También actúa como agente protector contra el daño oxidativo, así como osmorregulador y ayuda a equilibrar la expansión celular y puede potenciar varios metabolismos básicos para adaptarse al estrés de NaCl (Li et al., 2023)

P. putida KT2440 y su respuesta al estrés por desecación

Pseudomonas putida KT2440 es una bacteria saprófita, Gram-negativa que coloniza eficientemente la rizósfera de las plantas (Molina-Romero et al., 2017), y contribuye la protección vegetal a ciertos fitopatógenos (Matilla, et al., 2010). Además, esta bacteria es capaz de degradar ciertos compuestos tóxicos y aromáticos (Benndorf et al 2006; Roma-Rodríguez et al., 2010) y promueve el crecimiento en condiciones de estrés como elevada temperatura (Molina-Romero et al 2017) y alta salinidad (Costa-Gutiérrez 2020). A pesar de

contar con estas características y ser una bacteria candidata para promover el crecimiento de plantas, también se ha reportado que *P. putida* KT2440 es sensible a la desecación (Pazos-Rojas et al., 2019). Asimismo, se han realizado diversos estudios en los que se evalúa su comportamiento y supervivencia bajo condiciones de desecación y liofilización (Pazos-Rojas et al., 2018; Pazos-Rojas et al., 2019).

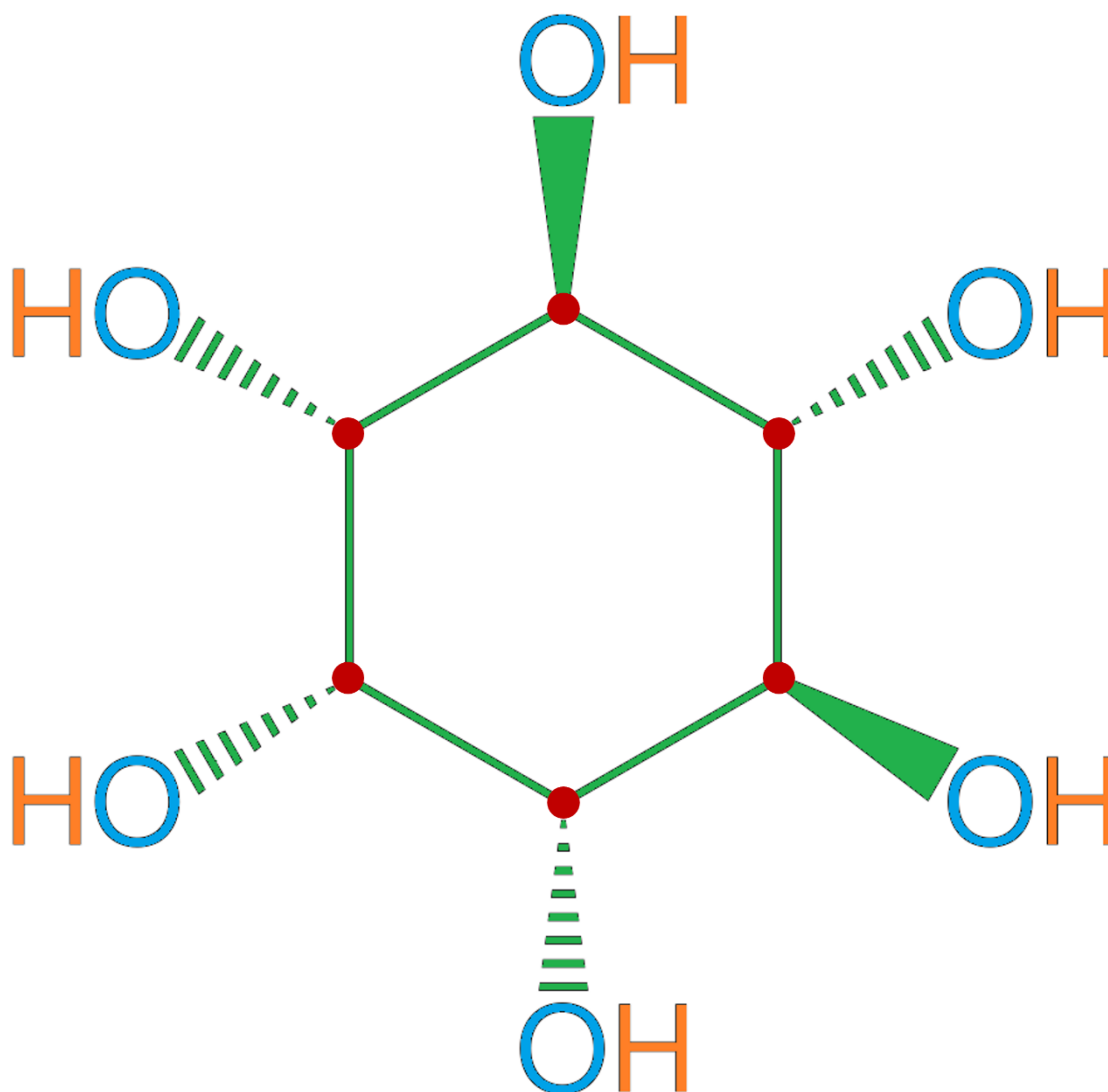


Figura 5. Molécula de myo-inositol elaborada mediante el modelo de cuñas. Los átomos de carbono se representan con los círculos rojos.

Muñoz-Rojas et al., 2006, observó que la tasa de supervivencia bacteriana (BSR; por sus siglas en inglés) de *P. putida* KT2440 sometida al proceso de liofilización depende fuertemente de la protección de la membrana celular. De acuerdo con los crioprotectores evaluados dentro de este estudio revelaron que los disacáridos como la trehalosa, proporcionan los valores más altos

de supervivencia bacteriana (Figura 6), mientras que compuestos como monosacáridos, polialcoholes y aminoácidos mostraron una protección significativamente menor. El tratamiento con myo-inositol, presentó una eficacia intermedia con respecto a la trehalosa. Asimismo, se observó que las células en fase estacionaria sobreviven mejor que las células en crecimiento exponencial, lo cual se correlaciona con membranas más rígidas y mayor contenido de ácidos grasos ciclopropano (C17:ciclopropano) (Muñoz-Rojas et al., 2006). Estos hallazgos mostraron la importancia de los osmoprotectores y del estado fisiológico en la protección frente a la pérdida extrema de agua sobre esta cepa bacteriana. Subsecuentemente, *P. putida* KT2440, se ha clasificado como una cepa bacteriana moderadamente tolerante a la desecación y además puede coexistir con múltiples bacterias de los géneros *Azospirillum* Sp7, *Acinetobacter* EMM02, y *Sphingomonas* OF178. Este comportamiento convierte a esta bacteria en una candidata viable para formar parte de mezclas microbianas funcionales (Molina-Romero et al., 2017b).

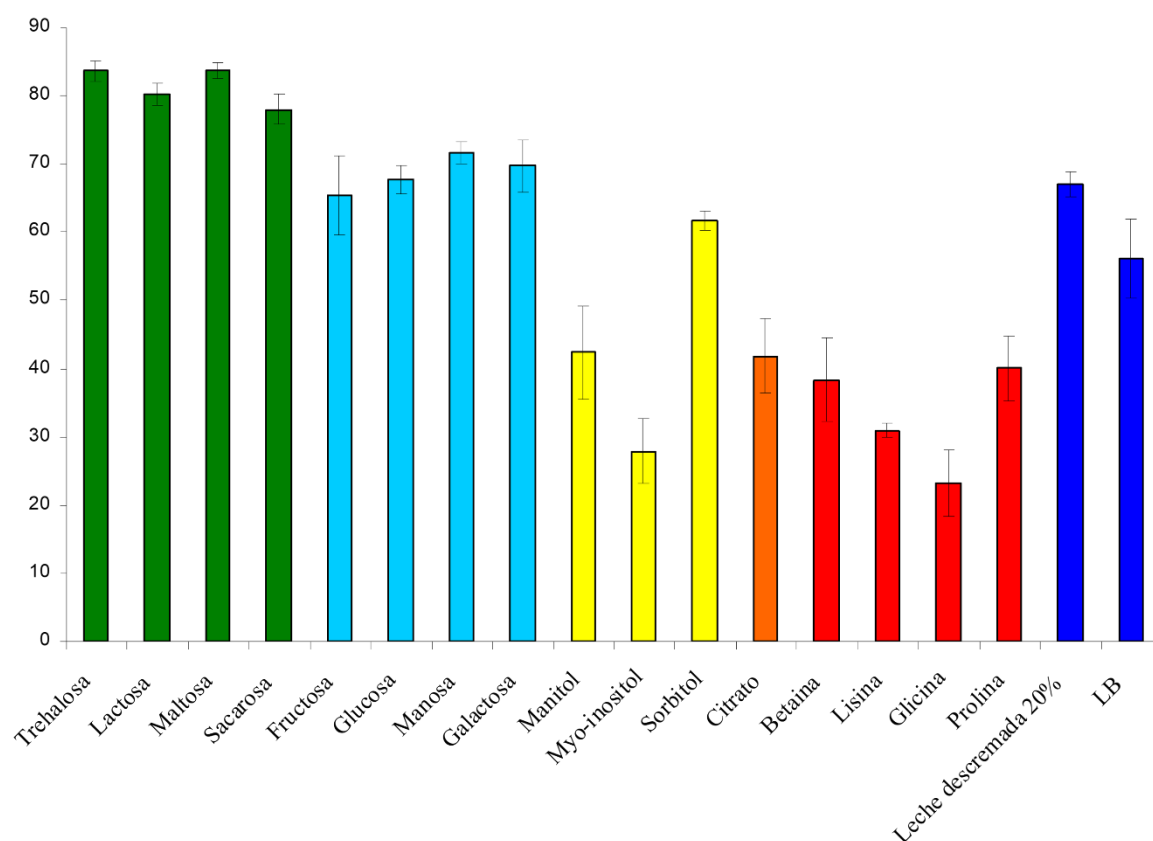


Figura 6. Ejemplos de lioprotectores que se han explorado para proteger a *Pseudomonas putida* KT2440 del proceso de liofilización y resguardo en condiciones de vacío. Los datos fueron tomados de Muñoz-Rojas et al., 2006. BSR significa tasa de supervivencia bacteriana y es la relación del (Log No. UFC/mL después de la liofilización + 1) dividido entre el (Log No. UFC/mL antes de la liofilización); cuyo resultado de la relación se multiplica por 100. La

concentración explorada de los compuestos explorados como lioprotectores fue de 200 mM. Para leche descremada, se usó una suspensión al 20%.

Por otra parte, Pazos-Rojas et al., 2019 demostró que *P.putida* KT2440 es altamente sensible a la desecación presentando una pérdida de viabilidad bacteriana a los 12 días después de ser evaluada en condiciones de desecación en ausencia de protectores. Sin embargo, la supervivencia bacteriana de esta cepa puede incrementarse significativamente a través de la adición de protectores como disacáridos no reductores (trehalosa y sacarosa) y polialcoholes como el myo-inositol, manitol o dulcitol, así como rehidratación prolongada (24 a 48 horas). Estos compuestos contribuyen a estabilizar la membrana durante la pérdida de agua, reduciendo el daño y evitando que las células entren en un estado viable pero no cultivable (VBNC). En particular, el myo-inositol ha mostrado un efecto protector intermedio, sugiriendo que puede interactuar con los fosfolípidos y preservar parcialmente la hidratación superficial de la bicapa, aumentando la supervivencia bacteriana frente a condiciones de desecación.

De igual manera, estudios recientes han evaluado mezclas de trehalosa y myo-inositol como protectores durante la liofilización y resguardo sin uso de vacío durante 12 días de *P. putida* KT2440 (Alonso-Torres, 2023). Se ha reportado que trehalosa en concentraciones superiores a 100 mM mantiene BSR altamente tolerante, mientras que el incremento de myo-inositol por encima de 150 mM disminuye significativamente la tasa de supervivencia bacteriana a niveles de baja tolerancia (BSR 37–73), sugiriendo que este compuesto actúa principalmente como osmolito y no como estabilizador de membranas. En contraste, mezclas equilibradas de ambos protectores (200 mM cada uno) permiten mantener viabilidad cercana a 9 log UFC/mL durante 12 días posteriores a la liofilización, indicando un efecto sinérgico cuando se combinan adecuadamente (Alonso-Torres, 2023).

Debido a que *Pseudomonas putida* KT2440 es una cepa con características fisiológicas, ecológicas y biotecnológicas que la hacen altamente relevante para aplicaciones agrícolas (Vázquez-Martínez & Muñoz-Rojas et al., 2023), incluso en condiciones de desecación (Alonso-Torres et al., 2023), es que será objeto de estudio en este trabajo.

Justificación

Las bacterias que muestran cierta tolerancia a la desecación podrían sobrevivir en ambientes de baja disponibilidad de agua, esto representa una ventaja para la formulación de inoculantes ya que pueden permanecer en los suelos durante largos periodos de tiempo y tras la rehidratación podrían mantener sus funciones benéficas. Por este motivo, los microorganismos tolerantes a la desecación son prometedores para la realización de inoculantes en polvo.

P. putida KT2440 es una bacteria que ha sido estudiada en promoción de crecimiento, adhesión bacteriana en semillas, colonización en raíces, así como en modelo para la búsqueda de genes implicados en la tolerancia a la liofilización y resguardo en vacío. Sin embargo, esta bacteria es muy sensible a la desecación ambiental y al resguardo sin vacío tras la liofilización. Recientemente en el grupo de investigación encontramos que la mezcla de trehalosa/myo-inositol es capaz de proteger efectivamente a *P. putida* KT2440 al proceso de liofilización y su resguardo a corto plazo (12 días) a temperatura ambiente y sin condiciones de vacío.

Debido a lo anterior, en el presente proyecto se evaluó la capacidad de los protectores como trehalosa y myo-inositol, para proteger a *P. putida* KT2440 de la liofilización y su resguardo a tiempos mayores a 12 días bajo condiciones de 30 °C, 50% de Humedad Relativa (HR) y sin vacío.

Hipótesis

La mezcla de trehalosa/myo-inositol permitirá que *P. putida* KT2440 sobreviva en números altos después de la liofilización y también le permitirá una mayor supervivencia durante el resguardo a largo plazo a temperatura de 30 °C, 50% de HR y sin vacío.

Objetivo general

Determinar la capacidad de la mezcla trehalosa/myo-inositol para proteger a *P. putida* KT2440 del proceso de liofilización y posterior resguardo sin condiciones de vacío, 50% HR y a temperatura de 30 °C.

Objetivos particulares

- Evaluar la supervivencia de *P. putida* KT2440, posterior al proceso de liofilización y en días posteriores al resguardo a largo plazo sin condiciones de vacío, 50% HR y a temperatura de 30 °C.
- Evaluar el daño que sufre la membrana de *P. putida* KT2440 antes y después de la liofilización y durante su resguardo en condiciones de 30 °C, 50% HR y sin vacío.

Metodología

Medio de cultivo

Pseudomonas putida KT2440 fue precultivada en 10 mL de medio líquido LB (Luria-Bertani) suplementada con 100 µg/mL de cloranfenicol (LB-Cm⁸⁰) durante 24 horas a una temperatura de 30 °C con agitación de 180 rpm. Se midió la densidad óptica (DO) del cultivo a 620 nm y se ajustó el precultivo para inocular un matraz con 50 mL de medio LB-Cm⁸⁰ a una DO de 0.05 y se dejó crecer hasta fase estacionaria (aproximadamente a una densidad óptica de 5.0) (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006).

El cultivo en fase estacionaria se dividió en tubos de 10 mL y se centrifugaron a 7000 rpm durante 10 minutos para la obtención del pellet. Posteriormente, las células bacterianas fueron lavadas con agua destilada estéril. Este proceso se repitió dos veces con el fin de que los sedimentos de cada tubo se mezclen con los protectores descritos en la tabla 2.

Tabla 2. Protectores usados en este trabajo que se adicionaron a las células de *Pseudomonas putida* KT2440 antes del proceso de liofilización.

TRATAMIENTOS	PROTECTOR
<i>P. putida</i> KT2440 (Control)	Agua destilada
<i>P. putida</i> KT2440 (T1)	Trehalosa 200 mM
<i>P. putida</i> KT2440 (T2)	Myo-inositol 200 mM
<i>P. putida</i> KT2440 (T3)	Trehalosa y Myo-inositol 200 mM
<i>P. putida</i> KT2440 (T4)	Trehalosa y Myo-inositol 100 mM

Condiciones de liofilización y determinación de número de células viables.

Los diferentes tratamientos se distribuyeron en tubos Eppendorf con capacidad de 600 µl y cada uno se le agregaron 100 µl de la suspensión bacteriana previamente hecha con el protector y se cubrieron con algodón estéril.

Las muestras procesadas se congelaron a una temperatura de -80 °C durante 24 horas. Una vez finalizado el tiempo, cada uno de los tratamientos se colocaron en la cámara de desecación del liofilizador Virtis a una condición de vacío de 30 mTorr durante 24 horas.

Al finalizar, las muestras fueron resguardadas en una cámara de secado con 50% de HR y a una temperatura de 30 °C.

En cada tratamiento, se utilizaron 5 repeticiones para verificar y determinar el número Unidades Formadoras de Colonias (UFC) presentes antes y después de la liofilización, así como durante el periodo de resguardo.

Posteriormente, cada uno de los tratamientos liofilizados fueron monitoreados e hidratados con agua estéril en dos condiciones: 1) rehidratación rápida (20 minutos) y rehidratación prolongada (24 horas) (Alonso-Torres et al., 2023; Pazos-Rojas et al., 2019).

Estas dos variables se evaluaron cada 3 días durante un mes y cada 12 días hasta finalizar las muestras. La rehidratación prolongada se realizó porque previamente se ha reportado que *P. putida* KT2440 es capaz de entrar a una fase viable pero no cultivable durante la desecación a 30 °C y 50% de HR..

Para la rehidratación, se agregó el mismo volumen inicial que había antes de la liofilización (100 µL de agua destilada estéril). El contenido se agitó homogéneamente antes del monitoreo y se cuantificó la tasa de supervivencia bacteriana (BSR; de sus siglas en inglés “Bacterial Survival Ratio”).

La tasa de supervivencia bacteriana se calculó en la relación del logaritmo del número de células bacterianas presentes en la muestra después de la liofilización (DPL), respecto al logaritmo del número de células viables antes liofilización (AL) multiplicada por 100 (Alonso-Torres, 2023; Pazos-Rojas et al., 2018; Muñoz-Rojas et al., 2006) y se evaluó por el método de goteo en placa por sellado masivo (Corral-Lugo et al., 2012)

$$BSR = \frac{\left(\log \left(\frac{UFC}{ml} * DL + 1 \right) \right)}{\left[\left(\log \frac{UFC}{ml} AL \right) \right]} \times 100$$

Las células bacterianas cuantificadas antes y después de la liofilización se clasificaron por 5 categorías de colores propuesto por Pazos-Rojas et al., (2018) (Figura 7).

Esta categoría se utilizó para describir la tolerancia bacteriana durante los 66 días monitoreados y evaluar si los protectores en el presente proyecto son eficientes para proteger a la bacteria cuando es sometida a condiciones liofilización.

Bacterias altamente tolerantes.	(BSR>80)	
Bacterias tolerantes.	(60<BSR≤80)	
Bacterias tolerantes medias.	(40<BSR≤60)	
Bacterias tolerantes bajas.	(20<BSR≤ 40)	
Bacterias de baja tolerancia.	(BSR≤20)	

Figura 7. Clasificación de la tolerancia a la desecación de bacterias usando colores, en acuerdo a Pazos-Rojas et al., 2018.

Evaluación del daño a la membrana de *P. putida* KT2440

Para evaluar el daño de la membrana de *P. putida* KT2440, la cepa bacteriana se cultivó hasta la fase estacionaria. Posteriormente, se tomaron 5 muestras de cada uno de los tratamientos liofilizados y resguardados a 30 °C, 50% HR y sin vacío; cada muestra se rehidrató durante 20 minutos y 24 horas y se realizó la cuantificación bacteriana (Alonso-Torres,2023; Pazos-Rojas et al., 2019). También se realizó la cuantificación en células antes de la liofilización.

El daño a la membrana se monitoreó a *P.putida* KT2440 con los protectores antes de ser liofilizados, en el día 12 y 66 después de la liofilización.

Para la medición del daño a la membrana se utilizó el kit de viabilidad bacteriana L7007 LIVE/DEAD BacLight para microscopía (Molecular Probes Invitrogen Detection Technologies). Con el fin de poder indicar si las bacterias protegidas con trehalosa y mio-inositol mantienen una membrana íntegra.

Este kit utiliza dos colorantes fluorescentes para diferenciar células vivas y células muertas; SYTO 9 y ioduro de propidio (PI), ambos intercalantes de ácidos nucleicos, pero con diferente permeabilidad de membrana (Pazos-Rojas et al., 2024). SYTO 9 penetra todas las células y tiñe el ADN de verde, mientras que PI solo penetra células con membranas comprometidas y tiñe el ADN de rojo. Cuando ambos colorantes están presentes, el PI desplaza al SYTO 9 y predomina la fluorescencia roja en células no viables, permitiendo así distinguir viables de no viables mediante microscopía o citometría de flujo (Berney et al., 2019; Busscher et al., 2014). Todas las muestras se observaron con el microscopio de fluorescencia VE-146YT.

Resultados

Supervivencia a largo plazo de *P. putida* KT2440 en presencia de trehalosa y mio-inositol monitoreada a los 20 minutos y 24 horas después de la hidratación

Los resultados de esta fase experimental mostraron que la bacteria está en poblaciones altas antes de la liofilización (Figura 8) y es semejante inmediatamente tras la liofilización; solo en el tratamiento control hubo una ligera disminución de células después de la liofilización (figura 9).

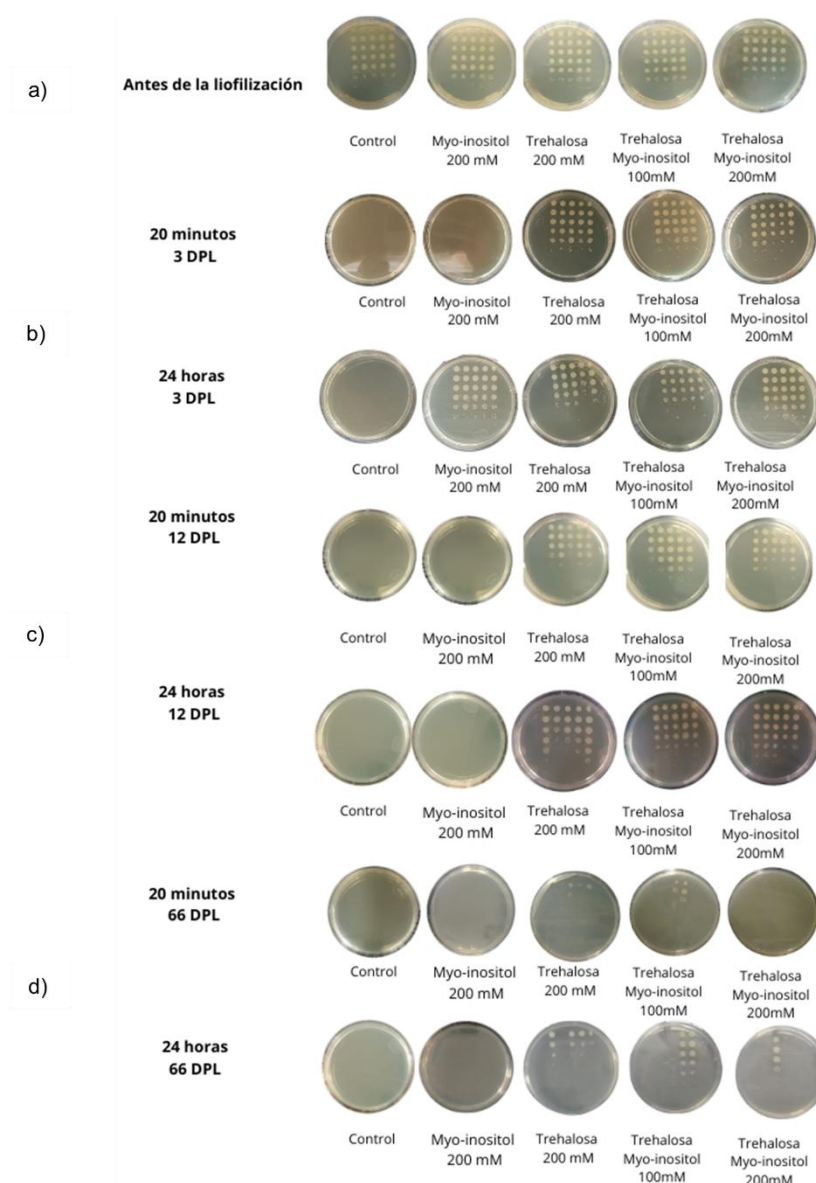


Figura 8. Recuperación de *P. putida* KT2440 en medio LB (Luria-Bertani) monitoreada antes y después de la liofilización, así como durante su resguardo. Se realizó monitoreo durante 66 días posteriores a la liofilización (DPL), evaluando la viabilidad bacteriana durante hidratación corta (20 minutos) e hidratación prolongada (24 horas), por el método de goteo en placa por sellado masivo (MGPSM). A) Muestras fotografiadas de *P. putida* KT2440 antes de la liofilización b) 3 días posteriores a la liofilización, c) 12 días posteriores a la liofilización d) 66 días posteriores a la liofilización.

Durante la evaluación de la supervivencia de *P. putida* KT2440 a la liofilización en condiciones de rehidratación rápida (20 minutos), se observó que utilizando myo-inositol 200 mM, inicialmente hubo una supervivencia alta (92.13 ± 3.87) que se mantuvo hasta el día 6 (81.96 ± 5.52) y después decreció a valores no detectables a partir del día 9. Para el tratamiento con trehalosa 200 mM (92.13 ± 3.87 a 81.96 ± 5.52) los primeros 6 días de monitoreo la BSR fue altamente tolerante y se mantuvo hasta el día 54, exceptuando el día 30 y 66 que obtuvo valores tolerante media (59.09 ± 3.46 y 51.21 ± 7.55).

El tratamiento con la mezcla de trehalosa y myo-inositol 100 mM mostró una BSR altamente tolerante los primeros 9 días posteriores a la liofilización (88.12 ± 9.55 , 85.47 ± 7.20 , 81.68 ± 0.47 , 82.35 ± 6.81), en cambio al usar una concentración de 200 mM esta alta tolerancia se mantuvo hasta el día 15 DPL.

Subsecuentemente, a los 18, 21, 24, 27, 30, 42 y 54 DPL la evaluación de la BSR se mantuvo en valores tolerantes después de la liofilización ($60 < \text{BSR} \leq 80$), pero a partir del día 66 para los dos tratamientos comenzaron a disminuir a valores de tolerancia media.

Para el tratamiento control (sin protector) alcanzó una tolerancia alta cuando las muestras fueron evaluadas al día 0, es decir después de haber sido liofilizadas (80.49 ± 3.28), sin embargo, a partir del día 3 ya no se detectaron células cultivables (0.00 ± 0.00) (Figura 9; Tabla 3).

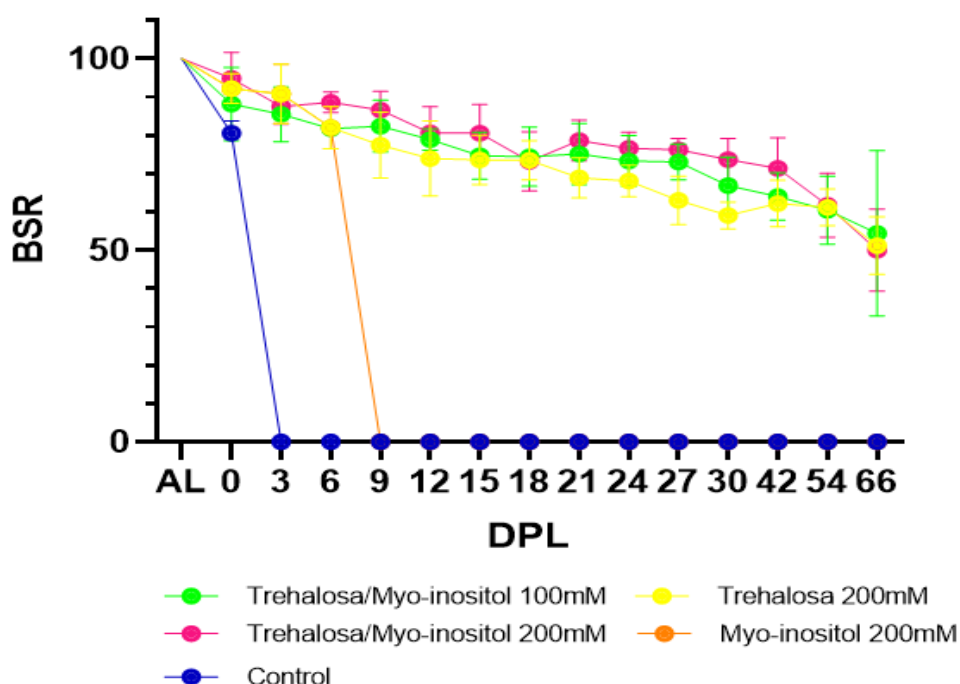


Figura 9. Representación gráfica de la tasa de supervivencia bacteriana de *P. putida* KT2440 a los 20 minutos tras la hidratación, monitoreada hasta los 66 días después de la liofilización. Los valores representan la media $\pm$ desviación estándar ($n=5$) por cada tratamiento. (a) AL significa antes de la liofilización. b) DPL significa días posteriores a la liofilización.

Tabla 3. Supervivencia de *P. putida* KT2440 en liofilizados rehidratados durante 20 minutos.

BSR	Tratamientos					
	DPL	Control	Myo-inositol 200mM	Trehalosa 200mM	Myo-inositol/ Trehalosa 100mM	Myo-inositol/ Trehalosa 200mM
	Tiempo	20 minutos				
	AL	100	100	100	100	100
	Día 0	80.49±3.28	92.13±3.87	92.13±3.87	88.12±9.55	94.87±6.86
	Día 3	00.00±0.00	90.81±7.69	90.81±7.69	85.47±7.20	87.50±4.58
	Día 6	00.00±0.00	81.96±5.52	81.96±5.52	81.68±0.47	88.60±2.70
	Día 9	00.00±0.00	00.00±0.00	77.44±8.62	82.35±6.81	86.56±4.90
	Día 12	00.00±0.00	00.00±0.00	73.91±9.80	78.84±2.83	80.62±6.77
	Día 15	00.00±0.00	00.00±0.00	73.57±6.41	74.63±61.90	80.55±7.53
	Día 18	00.00±0.00	00.00±0.00	73.49±5.15	74.38±6.91	73.17±7.68
	Día 21	00.00±0.00	00.00±0.00	68.88±5.22	75.10±7.98	78.56±5.32
	Día 24	00.00±0.00	00.00±0.00	68.07±4.15	73.33±6.66	76.62±4.27
	Día 27	00.00±0.00	00.00±0.00	63.05±6.37	73.04±4.67	76.25±2.98
	Día 30	00.00±0.00	00.00±0.00	59.09±3.46	66.87±7.42	73.68±5.54
	Día 42	00.00±0.00	00.00±0.00	62.23±6.10	64.00±6.19	71.38±7.96
	Día 54	00.00±0.00	00.00±0.00	61.15±4.76	60.41±8.94	61.74±8.30
Día 66	00.00±0.00	00.00±0.00	51.21±7.55	54.37±21.62	50.03±10.75	

BSR significa tasa de supervivencia bacteriana. Cada valor corresponde al promedio de cinco réplicas por tratamiento, obtenidas a partir de tres experimentos independientes monitoreado durante 66 días, acompañado de su respectiva desviación estándar. El código de colores mostrado en el cuadro indica la categorización de la tasa de supervivencia bacteriana de *P. putida* KT2440 posterior a la liofilización: a) azul (bacterias altamente tolerantes, BSR > 80), verde (tolerantes, $60 < \text{BSR} \leq 80$), amarillo claro (tolerancia media, $40 < \text{BSR} \leq 60$), amarillo oscuro (tolerancia baja, $20 < \text{BSR} \leq 40$) y rojo (tolerancia muy baja, $\text{BSR} \leq 20$). Los datos representados fueron obtenidos mediante la ecuación $\text{BSR} = [(\text{Log UFC/ml DL} + 1) / \text{Log UFC AL}] \times 100$. (a) AL significa antes de la liofilización. (b) DPL significa días posteriores a la liofilización.

Posteriormente, en la evaluación de hidratación prolongada (24 horas), el grupo control la BSR disminuyó de forma similar a lo observado en rehidratación rápida (Figura 10; Tabla 4). El tratamiento de myo-inositol 200 mM, mostró una BSR de altamente tolerante a tolerante media durante los primeros 6 días de monitoreo, pero la supervivencia incluso fue más baja en relación con la rehidratación rápida (Figura 9 y 10). La BSR de trehalosa 200 mM cambió de tolerante media ($60 < \text{BSR} \leq 80$) a altamente tolerante ($\text{BSR} > 80$) los días 9, 12, 15, 18, 21 y 66 después de una hidratación prolongada.

En el tratamiento con la mezcla de myo-inositol y trehalosa a 100 mM, se observó un incremento en la supervivencia bajo condiciones de rehidratación prolongada. En este caso, el estado altamente tolerante, que en rehidratación corta se mantuvo hasta el día 12, se extendió hasta el día 15 cuando se aplicó una rehidratación prolongada (Tablas 3 y 4). Además, la BSR se mantuvo en tolerante hasta el día 66 de monitoreo con rehidratación prolongada (Tabla 4).

Por otro lado, para el tratamiento de la mezcla myo-inositol y trehalosa 200 mM la rehidratación prolongada cambió de categoría tolerante a altamente tolerante hasta el día 24 y se mantuvo como tolerante hasta el día 54, la tolerancia bajó a tolerante medio en el día 66 (Figura 10). En general, los resultados mostraron que los tratamientos de trehalosa y las mezclas de trehalosa con myo-inositol permitieron una buena supervivencia de *P. putida* KT2440 tras la liofilización y resguardo en condiciones de 30 °C, 50% HR y sin uso de vacío. La supervivencia del tratamiento de la mezcla trehalosa con myo-inositol 200 mM fue mejor que el tratamiento donde se usó trehalosa como protector. En la rehidratación prolongada se incrementan los valores de BSR especialmente en el tratamiento de la mezcla de trehalosa con myo-inositol 200 mM.

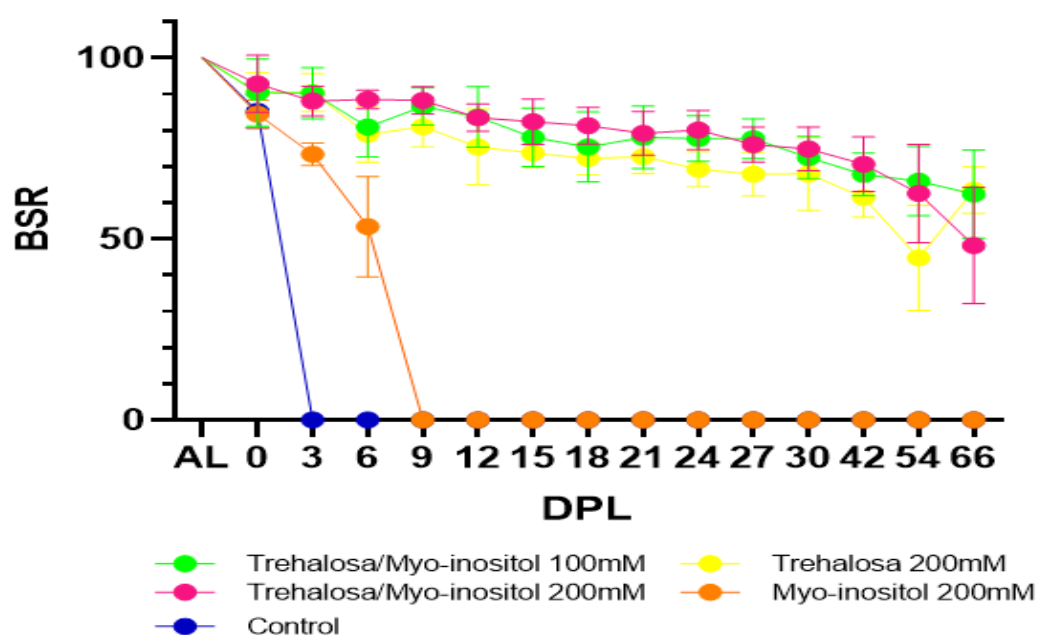


Figura 10. Representación gráfica de la tasa de supervivencia bacteriana de *P. putida* KT2440 a las 24 horas tras la hidratación, monitoreada durante 66 días después de la liofilización. Los valores representan la media $\pm$ desviación estándar ($n=5$) por cada tratamiento. (a) AL significa antes de la liofilización b) DPL significa días posteriores a la liofilización.

Tabla 4. Supervivencia de *P. putida* KT2440 en liofilizados rehidratados durante 24 horas.

BSR	Tratamientos					
	DPL	Control	Myo-inositol 200mM	Trehalosa 200mM	Myo-inositol/ Trehalosa 100mM	Myo-inositol/ Trehalosa 200mM
	Tiempo	24 horas				
	AL	100	100	100	100	100
	Día 0	85.16±4.63	84.51±3.88	90.51±5.32	90.44±9.25	92.85±7.92
	Día 3	00.00±0.00	73.34±3.18	90.41±5.25	90.25±7.03	88.05±4.13
	Día 6	00.00±0.00	53.44±13.88	78.89±7.74	80.91±8.23	88.54±2.59
	Día 9	00.00±0.00	00.00±0.00	80.96±5.63	86.6±5.15	88.20±3.75
	Día 12	00.00±0.00	00.00±0.00	75.44±10.48	83.65±8.34	83.49±3.75
	Día 15	00.00±0.00	00.00±0.00	73.78±3.96	78.03±8.11	82.36±6.20
	Día 18	00.00±0.00	00.00±0.00	72.16±4.55	75.39±9.59	81.29±5.03
	Día 21	00.00±0.00	00.00±0.00	72.72±4.71	78.01±8.68	79.18±6.06
	Día 24	00.00±0.00	00.00±0.00	69.27±4.86	77.71±6.32	80.06±5.38
	Día 27	00.00±0.00	00.00±0.00	67.86±6.04	77.66±5.52	76.06±4.87
	Día 30	00.00±0.00	00.00±0.00	67.96±10	72.42±5.89	74.86±6.07
	Día 42	00.00±0.00	00.00±0.00	61.42±5.48	67.82±5.93	70.61±7.49
	Día 54	00.00±0.00	00.00±0.00	44.74±14.52	65.92±9.59	62.54±13.60
	Día 66	00.00±0.00	00.00±0.00	63.49±6.44	62.35±12.18	48.13±16.09

BSR significa tasa de supervivencia bacteriana. Cada valor corresponde al promedio de cinco réplicas por tratamiento, obtenidas a partir de tres experimentos independientes monitoreado durante 66 días, acompañado de su respectiva desviación estándar. El código de colores mostrado en el cuadro indica la categorización de la tasa de supervivencia bacteriana de *P. putida* KT2440 posterior a la liofilización: a) azul (bacterias altamente tolerantes, BSR > 80), verde (tolerantes, 60 < BSR ≤ 80), amarillo claro (tolerancia media, 40 < BSR ≤ 60), amarillo oscuro (tolerancia baja, 20 < BSR ≤ 40) y rojo (tolerancia muy baja, BSR ≤ 20). Los datos representados fueron obtenidos mediante la ecuación $BSR = [(Log\ UFC/ml\ DL+1) / Log\ UFC\ AL] \times 100$. (a) AL significa antes de la liofilización. (b) DPL significa días posteriores a la liofilización

Efecto de trehalosa y myo-inositol en la integridad de la membrana de *P. putida* KT2440 tras liofilización

Para evaluar la integridad de la membrana de *P. putida* KT2440 después de la liofilización, se utilizó el kit LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability en dos tiempos de rehidratación: 20 minutos y 24 horas.

Las muestras se evaluaron antes de la liofilización y posteriormente a los 12 y 66 días post-liofilización (DPL) (resguardo), lo que permitió determinar el efecto protector de los tratamientos sobre las membranas bacterianas a lo largo del tiempo de resguardo. Las células de *P. putida* KT2440 mostraron predominantemente fluorescencia verde en todos los tratamientos antes de la liofilización (Figura 11A, 11D, 11G, 11J y 11M), lo que indica que las

membranas celulares se encontraban íntegras. Este patrón de células verdes coincide con los valores iniciales de BSR de 100 antes a la liofilización (Figura 9 y 10).

A los 12 DPL, los tratamientos con trehalosa 200 mM mostraron una mezcla de fluorescencia verde y roja (Figura 12 y 13 M, N y Ñ) tanto a los 20 minutos como a las 24 horas posteriores a la hidratación, indicando una pérdida parcial de integridad de membrana en algunas células. Los tratamientos con trehalosa + myo-inositol (100 mM y 200 mM) mostraron una prevalencia de células verdes en muestras de 12 DPL tanto a 20 min de rehidratación como a 24 horas de rehidratación (Figuras 12 y 13; DEF 100 mM y GHI 200mM). En contraste, los tratamientos con Myo-inositol 200 mM y el grupo control mostraron predominancia de fluorescencia roja, sin presencia significativa de fluorescencia verde en ninguna de las condiciones de tiempo de rehidratación (Figuras 12 y 13; ABC y JKL), lo cual coincide con los valores de baja tolerancia de BSR observados en estos tratamientos (Figura 9 y 10).

A los 66 DPL, el impacto de la liofilización y el almacenamiento prolongado fue más evidente. En el control y en el tratamiento con myo-inositol 200 mM, la BSR fue de 0, con fluorescencia exclusivamente roja, lo que confirma la incapacidad de estas condiciones para proteger a la bacteria frente al daño de membrana. Por el contrario, en los tratamientos con trehalosa 200 mM y las mezclas de trehalosa + myo-inositol (100 mM y 200 mM) se observaron fluorescencias verde, naranja y roja. A los 20 minutos posteriores a la rehidratación, la fluorescencia verde y naranja fue poco evidente, pero a las 24 horas se incrementó la proporción de células teñidas en verde y naranja, particularmente en los tratamientos con protectores combinados (Figuras 13 y 14; DEF 100 mM y GHI 200mM). Este comportamiento se correlacionó con valores de BSR entre 54.00 y 62.00 para trehalosa + myo-inositol y entre 51.21 y 64.49 para trehalosa 200 mM, lo que evidencia la capacidad de estos compuestos para mantener la integridad de la membrana .

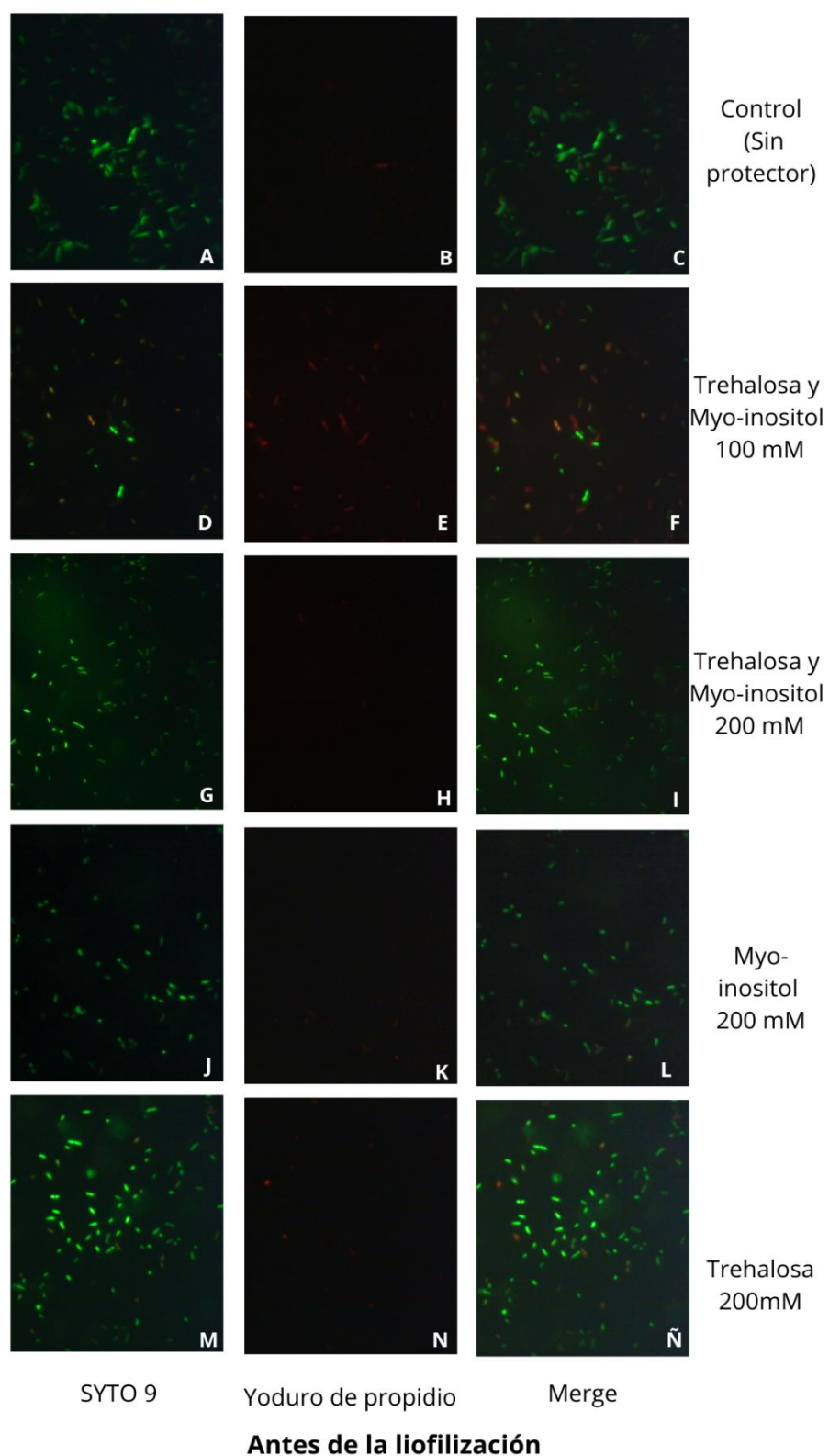


Figura 11. Micrografías de fluorescencia de *P. putida* KT2440 teñidas con el kit LIVE/DEAD BacLight evaluadas antes de ser sometidas a liofilización. Las imágenes muestran células vivas (verde, tinción con SYTO9) y células con daño en la membrana (rojo, tinción con yoduro de propidio). Las letras (A–C) Control sin protector, (D–F) Trehalosa y Myo-inositol 100 mM, (G–I) Trehalosa y Myo-inositol 200 mM, (J–L) Myo-inositol 200 mM y (M–Ñ) Trehalosa 200mM. En cada grupo de tres paneles: la primera imagen corresponde a la tinción con SYTO9, la segunda al yoduro de propidio, y la tercera a la fusión (merge) de ambas señales.

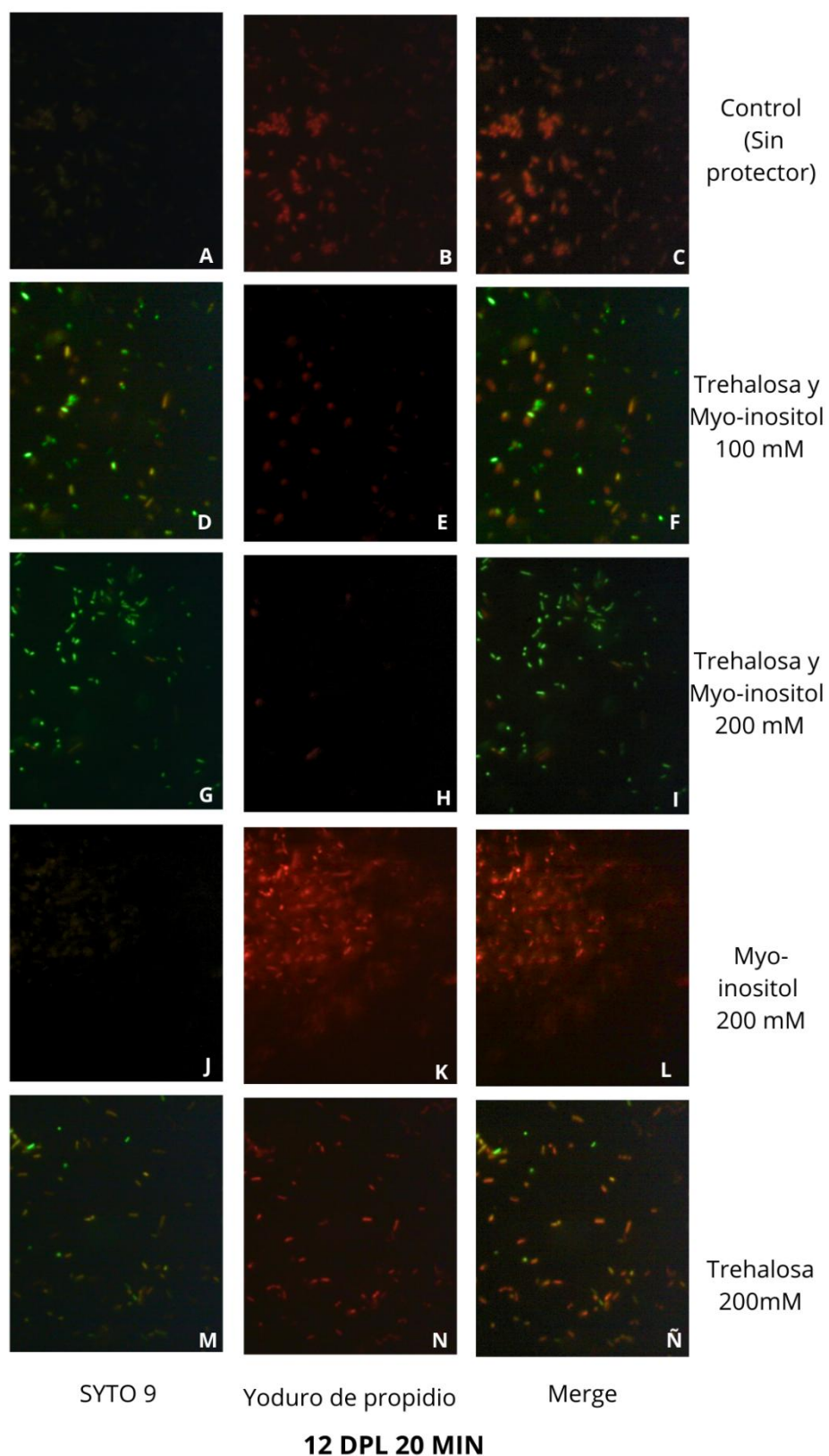
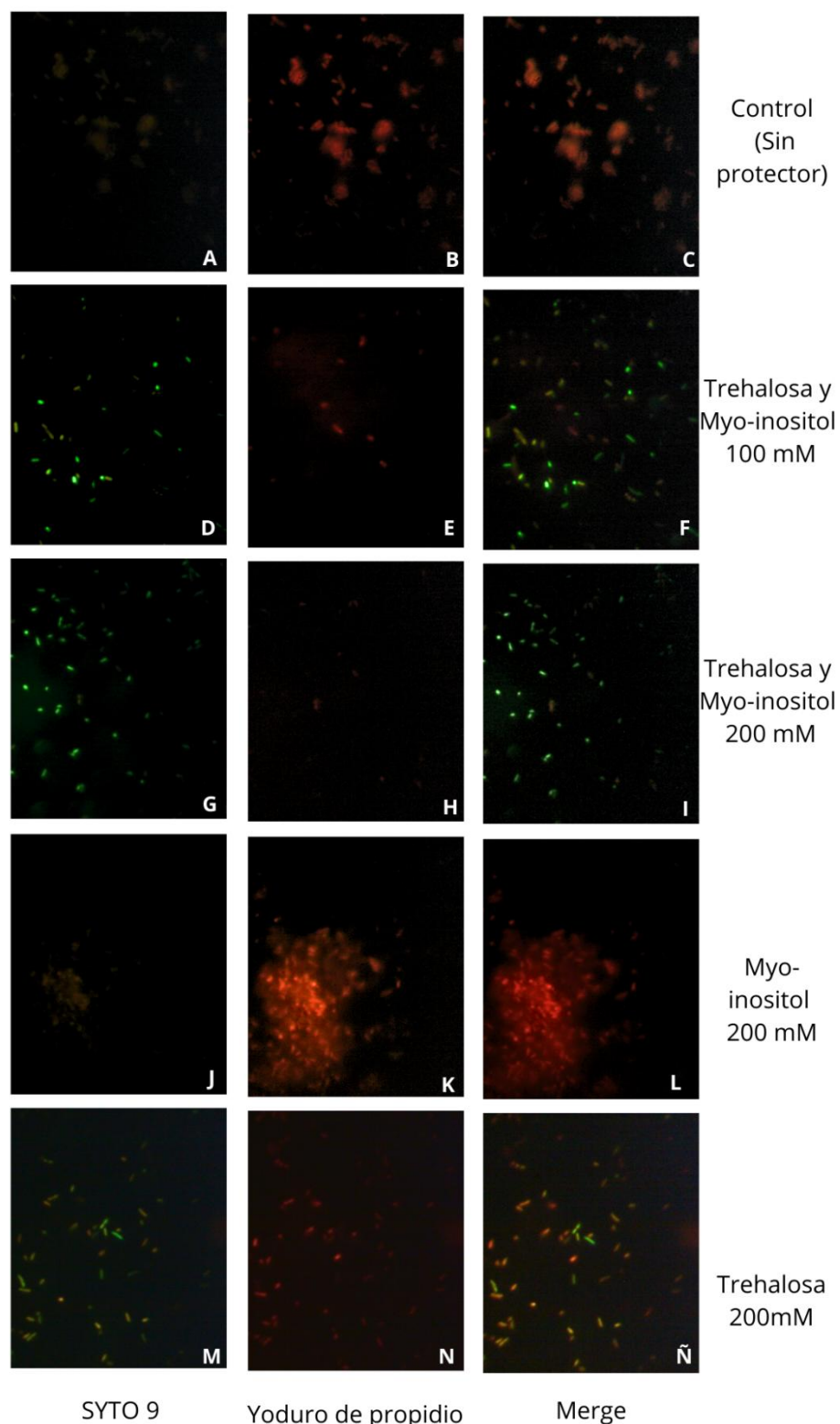


Figura 12. Micrografías de fluorescencia de *P. putida* KT2440 teñidas con el kit LIVE/DEAD BacLight. Las observaciones se realizaron a los 20 minutos de rehidratación, 12 días posteriores a la liofilización. Las imágenes muestran células vivas (verde, tinción con SYTO9) y células con daño en la membrana (rojo, tinción con yoduro de propidio). Las letras (A–C) Control sin protector, (D–F) Trehalosa y Myo-inositol 100 mM, (G–I) Trehalosa y Myo-inositol 200 mM, (J–L) Myo-inositol 200 mM y (M–Ñ) Trehalosa 200 mM. En cada grupo de tres paneles: la primera imagen corresponde a la tinción con SYTO9, la segunda al yoduro de propidio, y la tercera a la fusión (merge) de ambas señales.



24 HORAS

Figura 13. Micrografías de fluorescencia de *P. putida* KT2440 teñidas con el kit LIVE/DEAD BacLight. Las observaciones se realizaron a los 24 horas después de la rehidratación, 12 días posteriores a la liofilización. Las imágenes muestran células vivas (verde, tinción con SYTO9) y células con daño en la membrana (rojo, tinción con yoduro de propidio). Las letras (A–C) Control sin protector, (D–F) Trehalosa y Myo-inositol 100 mM, (G–I) Trehalosa y Myo-inositol 200 mM, (J–L) Myo-inositol 200 mM y (M–Ñ) Trehalosa 200 mM. En cada grupo de tres paneles: la primera imagen corresponde a la tinción con SYTO9, la segunda al yoduro de propidio, y la tercera a la fusión (merge) de ambas señales.

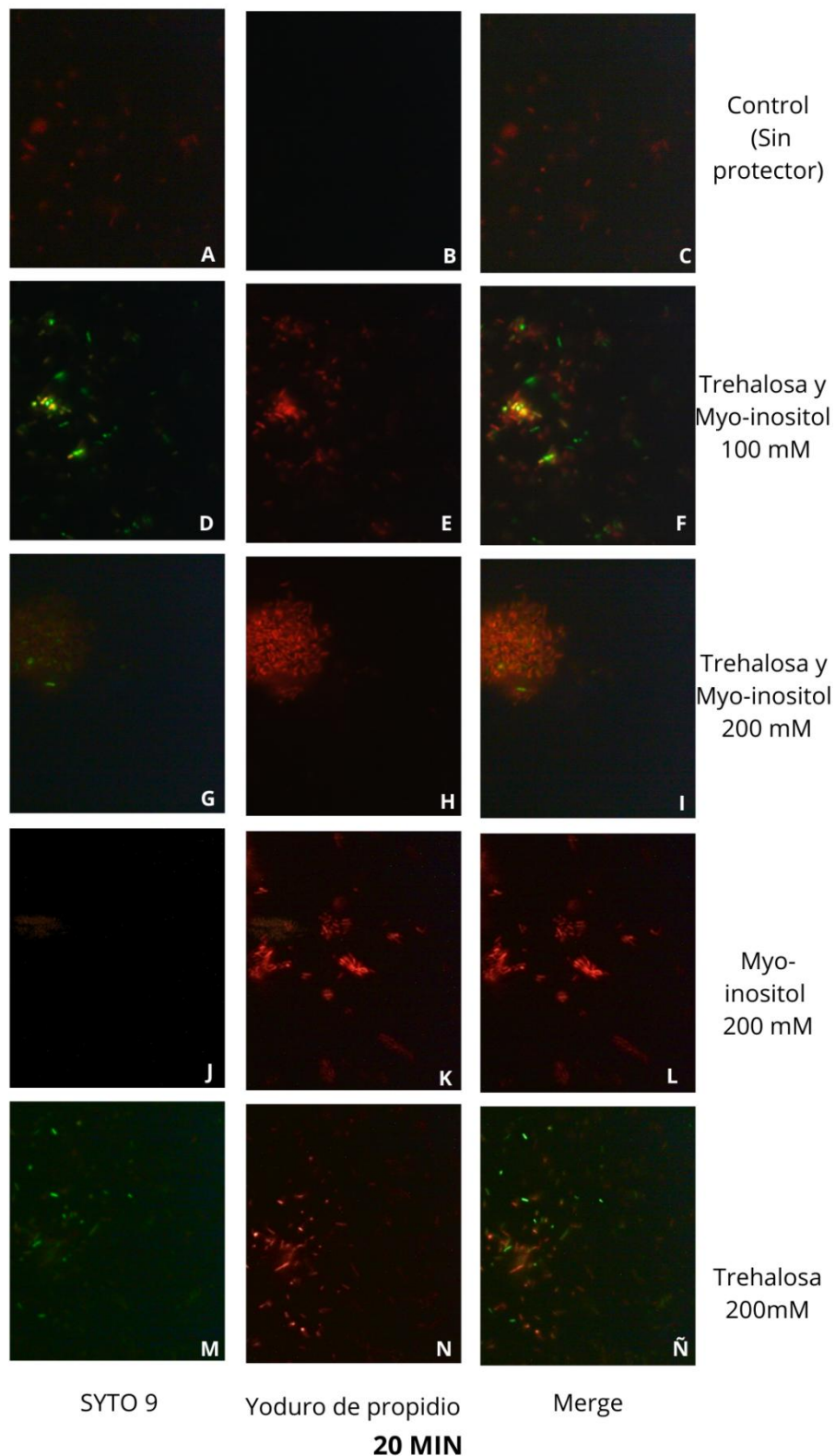
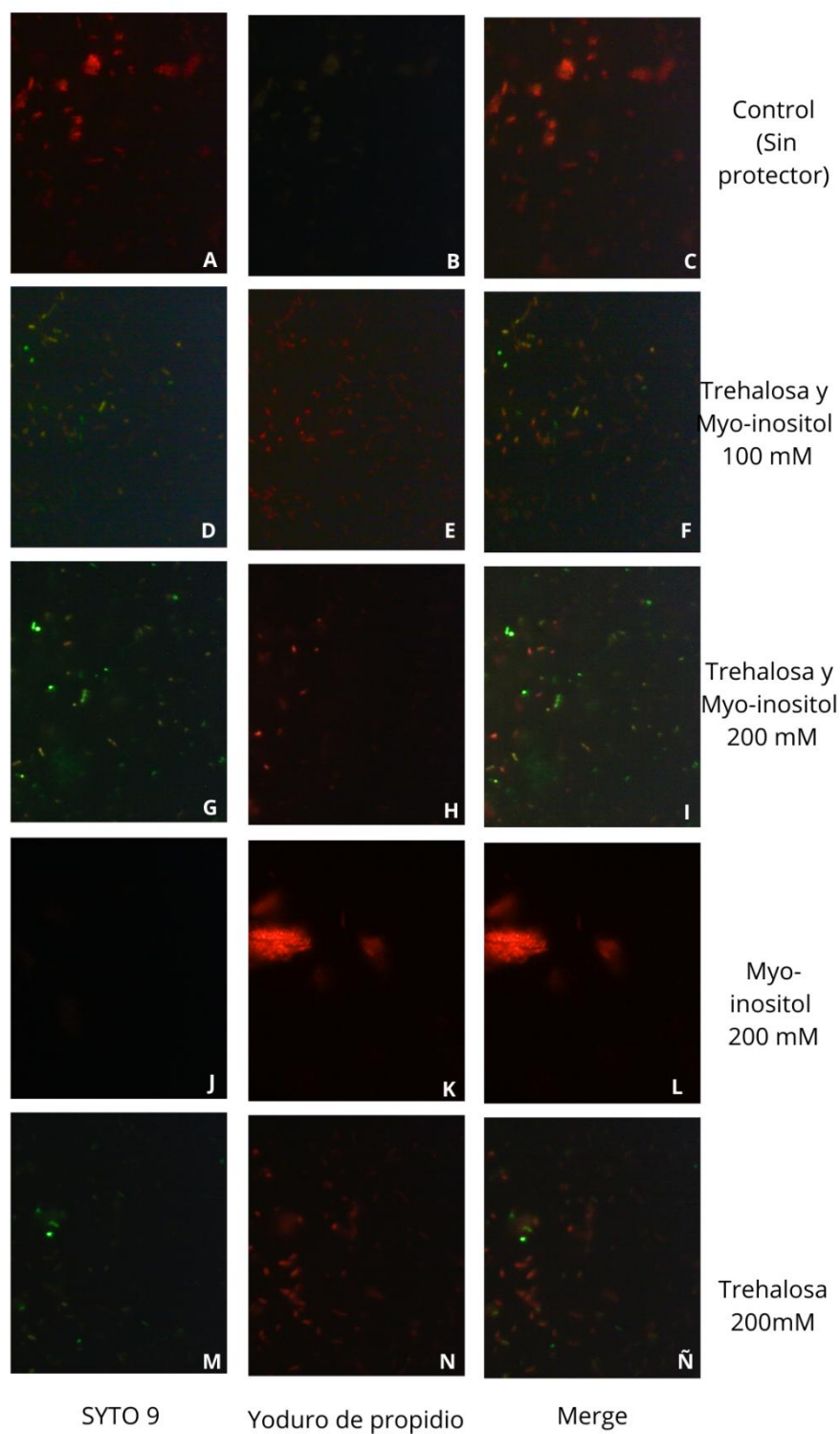


Figura 14. Micrografías de fluorescencia de *P. putida* KT2440 teñidas con el kit LIVE/DEAD BacLight. Las observaciones se realizaron a los 20 minutos después de la rehidratación, 66 días posteriores a la liofilización. Las imágenes muestran células vivas (verde, tinción con SYTO9) y células con daño en la membrana (rojo, tinción con yoduro de propidio). Las letras (A–C) Control sin protector, (D–F) Trehalosa y Myo-inositol 100 mM, (G–I) Trehalosa y Myo-inositol 200 mM, (J–L) Myo-inositol 200 mM y (M–Ñ) Trehalosa 200mM. En cada grupo de tres paneles: la primera imagen corresponde a la tinción con SYTO9, la segunda al yoduro de propidio, y la tercera a la fusión (merge) de ambas señales.



24 HORAS

Figura 15. Micrografías de fluorescencia de *P. putida* KT2440 teñidas con el kit LIVE/DEAD BacLight. Las observaciones se realizaron a los 20 minutos después de la rehidratación, 66 días posteriores a la liofilización. Las imágenes muestran células vivas (verde, tinción con SYTO9) y células con daño en la membrana (rojo, tinción con yoduro de propidio). Las letras (A–C) Control sin protector, (D–F) Trehalosa y Myo-inositol 100 mM, (G–I) Trehalosa y Myo-inositol 200 mM, (J–L) Myo-inositol 200 mM y (M–Ñ) Trehalosa 200 mM. En cada grupo de tres paneles: la primera imagen corresponde a la tinción con SYTO9, la segunda al yoduro de propidio, y la tercera a la fusión (merge) de ambas señales.

Discusión

La liofilización es un proceso de deshidratación que implica la eliminación del agua contenida en una muestra mediante congelación y posterior sublimación del hielo bajo condiciones de vacío, con el fin de preservar células, proteínas y otros componentes biológicos (Assegehegn et al., 2018). Además, tiene la finalidad de reducir drásticamente la actividad metabólica y prevenir la degradación química o enzimática durante el almacenamiento. Sin embargo, las condiciones extremas presentes generan la formación de cristales de hielo y pérdida casi total de agua lo que provoca tensiones físicas y químicas capaces de comprometer la integridad estructural de las células (Franzé et al., 2018). Esta característica de desecar a la célula constituye uno de los factores de estrés más severos, ya que la pérdida del agua intracelular altera la organización estructural de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Gibney et al., 2015). El uso de lio protectores, además de mejorar la apariencia del producto final, ayuda asegurar la estabilidad química, bioquímica y biológica durante el proceso de liofilización (Ávila et al., 2015; Rodríguez et al., 2023).

En este sentido, la formulación de células con moléculas protectoras capaces de mantener la viabilidad durante la desecación representa una estrategia clave para extender la durabilidad de los inoculantes y garantizar su funcionalidad tras la rehidratación (Alonso-Torres, 2023). Sin embargo, no existen protectores universales y se debe explorar que lioprotectores son adecuados para cada cepa bacteriana (Morales-García et al., 2010).

Pseudomonas putida KT2440 es una bacteria gram-negativa y se considera una bacteria prometedora debido a su capacidad de promover el crecimiento en condiciones de estrés (Costa-Gutierrez et al., 2020; Molina-Romero et al., 2017a). Sin embargo, la exposición a condiciones de estrés como desecación reduce significativamente la viabilidad bacteriana de esta cepa, ya que se clasifica como una bacteria poco tolerante a esta condición (Molina-Romero et al., 2017b). Recientemente, en nuestro grupo de investigación se observó que *P. putida* KT2440 es protegida de la liofilización y resguardo a corto plazo (12 DPL) cuando se usa una mezcla trehalosa y myo-inositol en una concentración 200 mM como lioprotector (Alonso-Torres, 2023). Sin embargo, se desconocía si esta mezcla podría proteger a *P. putida* KT2440 durante un resguardo superior a los 12 días.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la tasa de supervivencia de *P. putida* KT2440 tras la liofilización y resguardo a largo plazo, se mantiene estable en aquellas muestras adicionadas con trehalosa 200 mM, tanto sola como en combinación de trehalosa y myo-inositol 100 mM y 200 mM a los 20 minutos después de la hidratación, así como a las 24 horas

posteriores a la hidratación. Esta alta tolerancia se mantuvo hasta el día 66 DPL. La combinación trehalosa con myo-inositol permitió una mejor supervivencia de la bacteria respecto a trehalosa sola y además la integridad de membrana fue mejor cuando se usa esta combinación.

Cabe destacar que este comportamiento se atribuye a la concentración utilizada, la cual fue seleccionada con base en el estudio de Alonso-Torres (2023), quien reportó estabilidad celular durante 12 días posteriores a la liofilización. En el presente trabajo, al extender el periodo de evaluación durante 66 días, se observó que estas concentraciones continuaron siendo efectivas para preservar la viabilidad bacteriana en condiciones de almacenamiento prolongado (30°C, 50% HR y sin condiciones de vacío).

Estos resultados sugieren que la formulación propuesta (trehalosa con myo-inositol 200mM), tiene un potencial prometedor y adecuado para la conservación de *P. putida* KT2440 a largo plazo en condiciones de liofilización. De igual manera, refuerzan la utilidad de emplear trehalosa y myo-inositol a una concentración de 100 mM y 200 mM como agentes protectores durante la liofilización, ya que ambos compuestos actúan mediante mecanismos bioquímicos y fisicoquímicos que estabilizan las estructuras celulares frente al estrés por deshidratación y congelación (Rodríguez-Andrade et al., 2018; Alonso-Torres et al., 2022).

La trehalosa al ser un disacárido no reductor tiene propiedades distintivas como estructura, simetría, solubilidad, estabilidad cinética, termodinámica y versatilidad (Teramoto et al., 2008). Además, presenta dos mecanismos de protección propuestos: el primero corresponde a la capacidad de formar una matriz vítrea (hipótesis de vitrificación) (Rosete-Enríquez et al., 2025), y el segundo consiste en el reemplazo del agua cuando su contenido celular es extremadamente bajo (hipótesis del reemplazo del agua) (Leslie et al., 1995). En este último mecanismo, los grupos hidroxilo del trehalosa sustituyen a los del agua, permitiendo la formación de enlaces de hidrógeno con fosfolípidos de membrana y proteínas. Este proceso contribuye a preservar la conformación nativa de estas biomoléculas y a prevenir la desnaturalización proteica o la fusión de membranas bajo condiciones de estrés (Murray et al., 2024). Por su parte, el myo-inositol, un polialcohol cíclico, también contribuye a la estabilización de las membranas mediante la formación de puentes de hidrógeno con las cabezas polares de los fosfolípidos, regulando la presión osmótica y previniendo la pérdida de integridad de la bicapa lipídica (Bhattacharya and Kundu, 2020). La combinación de ambos puede aportar sinergia: la trehalosa proporciona estabilidad química mientras que el myo-inositol puede mejorar la respuesta osmótica y la rehidratación, así como estabilidad física. De

esta manera, se mantiene la fluidez y organización de la membrana, reduciendo el riesgo de transiciones de fase dañinas que comprometen su funcionalidad.

Por otra parte, el uso de myo-inositol y del grupo control (sin protector) permitió que algunas células sobrevivieran a la rehidratación rápida (20 minutos) y hasta 6 días después de la liofilización (myo-inositol), reflejado en una alta tasa de supervivencia bacteriana inicial tolerante (BSR). No obstante, tras 24 horas de hidratación prolongada, la BSR no incrementó respecto a la rehidratación rápida, por el contrario hubo una disminución en el tratamiento con myo-inositol. Esto podría deberse al daño acumulado en proteínas debido a las condiciones de desecación ya que pueden sufrir glicación y condensarse mediante (Wang et al., 2020).

La rehidratación de células bacterianas, especialmente de aquellas almacenadas de forma prolongada, favorece la agregación de proteínas críticas, afectando la recuperación celular (Łupkowska et al., 2023). Esto podría explicar el impedimento en el crecimiento de *P. putida* KT2440 tras la evaluación de 24 horas posteriores a la hidratación.

En el caso de myo-inositol, aunque actúa como osmorregulador, su efecto se limita a proporcionar una protección física frente a cambios osmóticos, lo que resulta insuficiente para contrarrestar los estreses extremos que las células experimentan durante la liofilización, incluyendo: congelación rápida, formación de cristales de hielo, deshidratación severa y cambios osmóticos bruscos (Sun, W. & Luo, Y. 2025). Por otro lado, en el grupo control, donde solo se utilizó a *P.putida* KT2440 sin ningún protector, la membrana celular quedó completamente dañada, lo que explica que la tasa de supervivencia tras la rehidratación a los 20 minutos y 24 horas solo pudo ser cuantificada cuando las muestras terminaron el proceso de liofilización (0 DPL) y subsecuentemente a los 3 DPL la BSR fue nula. El uso de estos lioprotectores durante la liofilización contribuye significativamente a preservar la integridad de la membrana celular o proteínas frente a los efectos destructivos de la desecación (Karunнанithy et al., 2024).

En el trabajo presente se observó que la supervivencia de *P. putida* KT2440 en tratamientos sin protector y adicionados con myo-inositol 200 mM, no mejora tras la hidratación prolongada; lo que implica que las células no pueden entrar a un estado viable pero no cultivable (VBNC) en condiciones de liofilización como lo menciona Alonso-Torres (2023). En la desecación ambiental de *P. putida* KR2440 la bacteria entra a un estado viable pero no cultivable, posiblemente debido a que la desecación es gradual y la bacteria puede responder a este estrés (Pazos-Rojas et al., 2019). En contraparte, la liofilización es un método más agresivo ya que este proceso presenta cambios de la temperatura y la presión parcial del vapor de agua

son inferiores a la del punto triple del agua, es decir menor que 0,0099 °C y menor que 0,006 atm (Alonso-Torres et al., 2023; Santelices & Castro, 2020). En la liofilización, la bacteria es incapaz de alcanzar el estado viable no cultivable, lo que sugiere que este proceso es tan severo que induce daño irreversible en componentes celulares críticos, especialmente en la membrana, la cual juega un papel central en la supervivencia tras la rehidratación a diferencia en condiciones de desecación que la membrana bacteriana de *P. putida* KT2440 a una rehidratación prolongada. En contraste, bajo condiciones de desecación ambiental, las bacterias pueden entrar en un estado VBNC como estrategia de supervivencia frente al estrés, conservando la integridad de la membrana y recuperando posteriormente la cultivabilidad cuando las condiciones son favorables, como durante la rehidratación o en presencia de exudados vegetales, tal como fue descrito por Pazos-Rojas et al., (2019).

Para corroborar esta información se evaluó el daño a la membrana utilizando el kit LIVE/DEAD para determinar de manera precisa qué células presentan membranas comprometidas después de ser sometidas al proceso de liofilización.

Los resultados de este trabajo evidenciaron que las membranas celulares del grupo control y del tratamiento con myo-inositol 200 mM presentaron un daño severo, ya que las células teñidas con SYTO 9 no se observaron en el campo de visualización, incluso tras 20 minutos de hidratación y 24 horas posteriores a la rehidratación a los 12 días post liofilización (Figuras 4 y 5). La ausencia de fluorescencia verde y la predominancia de campos sin señal viable indican una pérdida total de integridad de la membrana.

En contraste, en el presente trabajo, el grupo control y el tratamiento con myo-inositol 200 mM no mostraron fluorescencia verde detectable, ni siquiera después de una hidratación prolongada, lo que indica una pérdida severa y posiblemente irreversible de la integridad de la membrana. Esta diferencia sugiere que la liofilización constituye un estrés significativamente más agresivo que la desecación ambiental evaluada por Pazos-Rojas et al. (2019), ya que combina congelación, deshidratación extrema y cambios bruscos de presión, lo que puede impedir la entrada al estado VBNC.

Por lo tanto, mientras que la desecación ambiental puede inducir un estado VBNC en *P. putida* KT2440 con daño parcial de la membrana, la liofilización bajo las condiciones evaluadas en este estudio provoca un daño estructural más profundo, particularmente a nivel de la membrana celular, que no puede ser revertido mediante rehidratación, aun cuando se emplea myo-inositol como agente protector.

En contraste, la presencia de trehalosa 200 mM, tanto de forma individual como en combinación, (trehalosa y myo-inositol 100 mM y 200 mM) contribuyó a mantener la integridad de la membrana, demostrando su efecto estabilizador frente a las tensiones físicas y químicas inducidas por la liofilización y la posterior rehidratación. En las micrografías teñidas con SYTO 9 se observó aún la presencia de células bacterianas viables (fluorescencia verde), cuando fueron evaluadas 20 minutos y 24 horas posteriores a la rehidratación, aunque en baja proporción a los 66 días después de la liofilización. Por el contrario, en los campos visualizados con yoduro de propidio se detectó una mayor intensidad de fluorescencia roja, lo que indica un aumento en la permeabilidad y pérdida de viabilidad celular en comparación con las células bacterianas antes del proceso de liofilización.

Conclusiones.

1. La liofilización constituye un proceso de estrés extremo para *P. putida* KT2440, el cual provoca una disminución sobre la tasa de supervivencia bacteriana y provoca un daño irreversible en la integridad de la membrana celular.
2. El grupo control (sin protector) mostró una pérdida total de viabilidad bacteriana, lo que confirma que la ausencia de compuestos protectores deja a la célula completamente expuesta a los efectos de la sublimación, así como los cambios de presión y temperatura.
3. El tratamiento con myo-inositol 200 mM tuvo un efecto negativo en mantener la viabilidad bacteriana y la integridad de la membrana de *P. putida* KT2440 tras la liofilización, evidenciado por la ausencia de fluorescencia verde a través de las observaciones con el kit LIVE/DEAD.
4. La mezcla con trehalosa y myo-inositol a una concentración de 100mM y 200 mM mostraron un efecto protector al preservar la integridad de la membrana de *P. putida* KT2440 incluso después de 66 días de resguardo posterior a la liofilización, evidenciando su contribución a la estabilidad celular durante el proceso de resguardo a 30 grados centígrados, 50% HR y sin vacío.
5. Trehalosa 200 mM demostró ser un agente protector eficaz en condiciones de liofilización, debido a que, al ser un azúcar no reductor, preservó la integridad de la membrana de *P. putida* KT2440, durante el proceso de liofilización así como la rehidratación.

Perspectivas

La mezcla de trehalosa y myo-inositol a una concentración de 100 mM y 200 mM demostraron tener una capacidad significativa para mantener la integridad de las membranas de *P. putida* KT2440 durante la liofilización, futuros estudios deben enfocarse en evaluar el efecto protector bajo condiciones de desecación, donde las células bacterianas se enfrentan un estrés menos extremo en comparación con la liofilización. En particular, se propone analizar la respuesta bacteriana utilizando estas concentraciones, con el objetivo de determinar si existe un efecto positivo en la preservación de la viabilidad y la estabilidad estructural celular.

Subsecuentemente, sería relevante extender estos experimentos a modelos de interacción planta-bacteria, con el fin de explorar si trehalosa 200 mM y la mezcla de myo-inositol y trehalosa 100 mM y 200 mM puede contribuir a mejorar la supervivencia de *P. putida* KT2440 cuando entra en contacto con los exudados de las plantas así como plantas, ar experimentos en condiciones de campo para evaluar la viabilidad de estos liofilos.

Bibliografía

Arakawa, T., Ejima, D., Tsumoto, K., Obeyama, N., Tanaka, Y., Kita, Y., & Timasheff, S. N. (2006). Suppression of protein interactions by arginine: A proposed mechanism of the arginine effects. *Biophysical Chemistry*, 127(1-2), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2006.12.007>

Almazora, S. M., (2008). Freeze-drying En C. hui, Food drying science and technology. *Pennsylvania, USA: Destech Publications Inc.* 403-405

Alonso-Torres, E., Yesmin, P. B., Alvarado-Pulido, J. J., Fuentes-Ramírez, L. E., Martínez-Morales, J., Muñoz-Rojas, J., & Morales-García, Y. E. (2022). Rumbo a la generación de inoculantes en polvo a base de *Pseudomonas putida* KT2440. *Zenodo (CERN European Organization For Nuclear Research)*. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7099040>

Armijo, C. J., Condorhuaman, C. C., Hilario, R. B., (2008). ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL CICLO DE LIOFILIZACIÓN DE PRODUCTOS ORGÁNICOS NATURALES. *Rev. Per. Quím. Ing. Quim*, 11(2) 23-28.

Assegehegn, G., La Fuente, E. B., Franco, J. M., & Gallegos, C. (2018). The Importance of Understanding the Freezing Step and Its Impact on Freeze-Drying Process Performance. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 108(4), 1378-1395. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.11.039>

Ávila, L., Naranjo, J., y Higueta, J. (2015). Viabilidad de levaduras y bacterias conservadas por liofilización: efecto de agentes lioprotectores. *Revista Vector*, 10, 7-13. http://vector.ucaldas.edu.co/downloads/Vector10_2.pdf [Links]

Bashan, Y., De-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J. (2013). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant And Soil*, 378(1-2), 1-33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>

Bashan, Y., de-Bashan, L.E., Prabhu, S.R. *et al.* Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant Soil* **378**, 1–33 (2014). <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>

Bhattacharya, S., and Kundu, A. (2020). “Sugars and sugar polyols in overcoming environmental stresses” in *Protective Chemical Agents in the Amelioration of Plant Abiotic Stress*. eds. A. Roychoudhury and D. K. Tripathi (Hoboken, NJ: John Wiley and Sons), 71–101.

Berninger, T., Mitter, B., Preininger, C., 2016. The smaller, the better? The size effect of alginate beads carrying plant growth-promoting bacteria for seed coating. *J. Microencapsul.* 33, 127–136. <https://doi.org/10.3109/02652048.2015.1134690>

Berninger, T., López, Ó. G., Bejarano, A., Preininger, C., & Sessitsch, A. (2017). Maintenance and assessment of cell viability in formulation of non-sporulating bacterial inoculants. *Microbial Biotechnology*, 11(2), 277-301. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12880>

Berninger, T., González López, Ó., Bejarano, A., Preininger, C., Sessitsch, A., 2018. Maintenance and assessment of cell viability in formulation of non-sporulating bacterial inoculants. *Microb. Biotechnol.* 11, 277–301. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12880>

Cappuccino, J. G., & Sherman, N. (2014). *Microbiology: A laboratory manual* (10th ed.). Pearson Education

Chantorn, S., Aekkawatchai, N., Kasinsak, K., & Oontawee, S. (2022). Preservation of *Paenibacillus polymyxa* BTK01 and *Bacillus subtilis* BTK07 as lignocellulolytic bacterial starters for industrial applications: Physicochemical conditions, enzyme stability, freeze-drying processes and cryoprotection. *Biocatalysis And Agricultural Biotechnology*, 42, 102326. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102326>

Corral-Lugo, A., Morales-García, Y.E., Pazos-Rojas, L.A., Ramírez-Valverde, A., Martínez-Contreras, R.D. y Muñoz-Rojas, J. (2012). Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de "Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo". *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 147-156

Coulibaly, I., Kouassi, E., N'guessan, E., Destain, J., Béra, F., & Thonart, P. (2018b). Lyophilization (Drying Method) Cause Serious Damages to the Cell Viability of Lactic Acid Bacteria. *Annual Research & Review In Biology*, 24(4), 1-15. <https://doi.org/10.9734/arrb/2018/39265>

Costa-Gutierrez, S. B., Lami, M. J., Santo, M. C. C., Zenoff, A. M., Vincent, P. A., Molina-Henares, M. A., Espinosa-Urgel, M., & De Cristóbal, R. E. (2020). Plant growth promotion by

Pseudomonas putida KT2440 under saline stress: role of *eptA*. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 104(10), 4577-4592. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10516-z>

Deaker, R. (2004). Legume seed inoculation technology? a review. *Soil Biology And Biochemistry*, 36(8), 1275-1288. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.04.009>

E., Quintero-Hernández, V., Villalobos-López, M. A., De la Torre, J., & Muñoz-Rojas, J. (2019). Desiccation-induced viable but nonculturable state in *Pseudomonas putida* KT2440, a survival strategy. *PLoS ONE*, 14(7), e0219554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219554>

El-Saadony, M. T., Saad, A. M., Soliman, S. M., Salem, H. M., Ahmed, A. I., Mahmood, M., El-Tahan, A. M., Ebrahim, A. A. M., El-Mageed, T. A. A., Negm, S. H., Selim, S., Babalghith, A. O., Elrys, A. S., El-Tarabily, K. A., & AbuQamar, S. F. (2022). Plant growth-promoting microorganisms as biocontrol agents of plant diseases: Mechanisms, challenges and future perspectives. *Frontiers In Plant Science*, 13, 923880. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.923880>

Florencio, C., Bortoletto-Santos, R., Favaro, C., Brondi, M., Velloso, C., Klaic, R., Ribeiro, C., Farinas, C., & Mattoso, L. (2022). AVANÇOS NA PRODUÇÃO e FORMULAÇÃO DE INOCULANTES MICROBIANOS VISANDO UMA AGRICULTURA MAIS SUSTENTÁVEL. *Química Nova*. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170909>

Franzé, S., Selmin, F., Samaritani, E., Minghetti, P., & Cilurzo, F. (2018). Lyophilization of Liposomal Formulations: Still Necessary, Still Challenging. *Pharmaceutics*, 10(3), 139. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030139>

Fouda, A. H., Hassan, S. E., Eid, A. M., & Ewais, E. E. (2015). Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (Bioss.). *Annals Of Agricultural Sciences*, 60(1), 95-104. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2015.04.001>

Gibney, P. A., Schieler, A., Chen, J. C., Rabinowitz, J. D., & Botstein, D. (2015). Characterizing the in vivo role of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae* using the AGT1 transporter. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 112(19), 6116-6121. <https://doi.org/10.1073/pnas.1506289112>

Gillaspy, G. E. (2011). The cellular language of myo-inositol signaling. *New Phytologist*, 192(4), 823-839. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03939.x>

Gómez-Luna, B. E., Hernández-Morales, A., Herrera-Méndez, C. H., Arroyo-Figueroa, G., Vargas-Rodríguez, L., & Olalde-Portugal, V. (2012). Aislamiento de bacterias promotoras del crecimiento de la rizósfera de plantas de guayaba (*Psidium guajava*). *Ra Ximhai*, 97-102. <https://doi.org/10.35197/rx.08.03.e1.2012.10.bg>

He, Y.H., Peng, Y.J., Wu, Z.S., Han, Y., Dang, Y., 2015. Survivability of *Pseudomonas putida* RS-198 in liquid formulations and evaluation its growth-promoting abilities on cotton. *J. Anim. Plant Sci.* 3, 180–189. Herrera-Estrella, L., López-Arredondo, D., 2016

Hubálek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46(3), 205-229. [https://doi.org/10.1016/s0011-2240\(03\)00046-4](https://doi.org/10.1016/s0011-2240(03)00046-4)

Jude, J., Adu, E. A., Kamaldeen, O. S., & Maiyanga, I. E. (2023). FREEZE DRYING – APPLICATION IN FOOD PROCESSING AND STORAGE (REVIEW). *BADEGGI JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH AND ENVIRONMENT*, 5(2), 21-35. <https://doi.org/10.35849/bjare202302/97/003>

Karunnnanithy, V., Rahman, N. H. B. A., Abdullah, N. A. H., Fauzi, M. B., Lokanathan, Y., Hwei, A. N. M., & Maarof, M. (2024). Effectiveness of Lyoprotectants in Protein Stabilization During Lyophilization. *Pharmaceutics*, 16(10), 1346. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16101346>

Katiyar, D. (2016). Plant Growth Promoting Rhizobacteria-an Efficient Tool for Agriculture Promotion. *Advances In Plants & Agriculture Research*, 4(6). <https://doi.org/10.15406/apar.2016.04.00163>

Kaushik, J. K., & Bhat, R. (2003). Why Is Trehalose an Exceptional Protein Stabilizer? *Journal Of Biological Chemistry*, 278(29), 26458-26465. <https://doi.org/10.1074/jbc.m300815200>

Leslie, S. B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J. H., Crowe, L. M. (1995). Trehalose and Sucrose Protect Both Membranes and Proteins in Intact Bacteria during Drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(10), 3592-3597. <https://doi.org/10.1128/aem.61.10.3592-3597.1995>

Li, H., Fan, Y., Zhang, H., & Chen, Y. (2023). Effects of Myo-Inositol on NaCl Stress in *Tamarix ramosissima*: Insights from Transcriptomics and Metabolomics. *Forests*, 14(8), 1686. <https://doi.org/10.3390/f14081686>

Łupkowska, A., Monem, S., Dębski, J., Stojowska-Swędryńska, K., Kuczyńska-Wiśnik, D., & Laskowska, E. (2023). Protein aggregation and glycation in *Escherichia coli* exposed to desiccation-rehydration stress. *Microbiological research*, 270, 127335. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127335>

Manjana, A., Banjana, A., Arijitmajumdar, D., & Tudu, J. N. (2016). Selection of Storage Methods for Maintenance of Different Stock Cultures. *International Journal Of Current Microbiology And Applied Sciences*, 5(10), 1097-1104. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.510.115>

Martínez-Álvarez, J. C., Castro-Martínez, C., Sánchez-Peña, P., Gutiérrez-Dorado, R., & Maldonado-Mendoza, I. E. (2016). Development of a powder formulation based on *Bacillus cereus* sensu lato strain B25 spores for biological control of *Fusarium verticillioides* in maize plants. *World Journal Of Microbiology And Biotechnology*, 32(5), 75. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-2000-5>

Molina-Romero, D., Bustillos-Cristales, M. R., Rodríguez-Andrade, O., Morales-García, Y. E., Santiago-Sáenz, Y., Castañeda-Lucio, M. y Muñoz-Rojas, J. (2015) Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biológicas*. 17(2). 24-34.

Molina-Romero D, Morales-García YE, Hernaández-Tenorio A-L, Castañeda-Lucio M, Netzahuatl MuñozAR, Muñoz-RojasJ. (2017a) Pseudomonasputidaestimulael crecimientode maíz en funcio´n de la tem peratura. *Rev Iberoam Ciencias*. ; 4: 80–88.

Molina-Romero, D., Baez, A., Quintero-Hernández, V., Castañeda-Lucio, M., Fuentes-Ramírez, L. E., Del Rocío Bustillos-Cristales, M., Rodríguez-Andrade, O., Morales-García, Y. E., Munive, A., & Muñoz-Rojas, J. (2017b). Compatible bacterial mixture, tolerant to desiccation, improves maize plant growth. *PLoS ONE*, 12(11), e0187913. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187913>

Morales-García, Y. E., Duque, E., Rodríguez-Andrade, O., De La Torre, J., Martínez-Contreras, R. D., Pérez-y-Terrón R, & Muñoz-Rojas, J. (2010). Bacterias Preservadas, una Fuente Importante de Recursos Biotecnológicos. *BioTecnología*, 14(2), 11-29. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5525288>

Morales-García, Y. E., Juárez-Hernández, D., Aragón-Hernández, C., Mascarua-Esparza, M. A., Bustillos-Cristales, M. R., Fuentes-Ramírez, L. E., Martínez-Contreras, R. D., & Muñoz-Rojas, J. (2012). Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter* spp., as a model for alternative agriculture. *PubMed*, 43(4), 287-293. <https://doi.org/10.1590/s0325-75412011000400009>

Morgan, C., Herman, N., White, P., & Vesey, G. (2006). Preservation of micro-organisms by drying; A review. *Journal Of Microbiological Methods*, 66(2), 183-193. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>

Murray, A., Kilbride, P. & Gibson, M. I. (2024). Trehalose in cryopreservation. Applications, mechanisms and intracellular delivery opportunities. *RSC Medicinal Chemistry*. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2024/md/d4md00174e>

Muñoz, D. (2017). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones. España: Universidad de Sevilla.

Muñoz-Rojas, J., Bernal, P., Duque, E., Godoy, P., Segura, A., & Ramos, J. (2006). Involvement of Cyclopropane Fatty Acids in the Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to Freeze-Drying. *Applied And Environmental Microbiology*, 72(1), 472-477. <https://doi.org/10.1128/aem.72.1.472-477.2006>

Naqqash, T., Hameed, S., Imran, A., Hanif, M. K., Majeed, A., & Van Elsas, J. D. (2016). Differential Response of Potato Toward Inoculation with Taxonomically Diverse Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Frontiers In Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00144>

Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 548-572. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.548-572.2000>

O'Callaghan, M., Ballard, R. A., & Wright, D. (2022). Soil microbial inoculants for sustainable agriculture: Limitations and opportunities. *Soil Use And Management*, 38(3), 1340-1369. <https://doi.org/10.1111/sum.12811>

Parray, J. A., Jan, S., Kamili, A. N., Qadri, R. A., Egamberdieva, D., & Ahmad, P. (2016). Current Perspectives on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Journal Of Plant Growth Regulation*, 35(3), 877-902. <https://doi.org/10.1007/s00344-016-9583-4>

Pazos-Rojas, L. A., Cuellar-Sánchez, A., Romero-Cerón A. L., Rivera-Urbalejo, A., Van Dillewijn, P., Luna-Vital, D. A., Muñoz-Rojas, J., Morales-García, Y. E., & Bustillos-Cristales M. R. (2024). The Viable but Non-Culturable (VBNC) State, a Poorly Explored Aspect of Beneficial Bacteria. *Microorganisms*, 12(1):39. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010039>

Pazos-Rojas, L. A., Muñoz-Arenas, L. C., Rodríguez-Andrade, O., López-Cruz, L. E., López-Ortega, O., Lopes-Olivares, F., Luna-Suarez, S., Baez, A., Morales-García, Y. E., Quintero-Hernández, V., Villalobos-López, M. A., De la Torre, J., & Muñoz-Rojas, J. (2019b). Desiccation-induced viable but nonculturable state in *Pseudomonas putida* KT2440, a survival strategy. *PLoS ONE*, 14(7), e0219554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219554>

Pazos-Rojas, L. A., Muñoz-Arenas, L. C., Rodríguez-Andrade, O., López-Cruz, L. E., López-Ortega, O., Lopes-Olivares, F., Luna-Suarez, S., Baez, A., Morales-García, Y. (2018). Desiccation-Tolerant Rhizobacteria Maintain their Plant GrowthPromoting Capability after Experiencing Extreme Water Stress. *SciFed Journal of Applied Microbiology*, 1(1): 1-13. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5068936>

Rodríguez, M. P. Q., Arango, D. M., Posada, D. C. R., & Gil, D. M. G. (2023). Conservación de bacterias por liofilización en la Colección de Microorganismos CM-EM-UDEA, Medellín, Colombia. *Biota Colombiana*, 24(2), e1127. <https://doi.org/10.21068/2539200x.1127>

Prakash, O., Nimonkar, Y., & Shouche, Y. S. (2012). Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS Microbiology Letters*, 339(1), 1-9. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12034>

Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., & Ramón, D. (1992). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(9), 2948–2953.

Reis, G. A. D., Martínez-Burgos, W. J., Pozzan, R., Puche, Y. P., Ocán-Torres, D., De Queiroz Fonseca Mota, P., Rodrigues, C., Serra, J. L., Scapini, T., Karp, S. G., & Soccol, C. R. (2024). Comprehensive Review of Microbial Inoculants: Agricultural Applications, Technology Trends in Patents, and Regulatory Frameworks. *Sustainability*, 16(19), 8720. <https://doi.org/10.3390/su16198720>

Ribeiro, C. M., & Cardoso, E. J. B. N. (2011). Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). *Microbiological Research*, 167(2), 69-78. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.03.003>

Rodríguez-Andrade, O., Bernal, P., Martínez-Contreras, R., et al. (2018) Estrategias bacterianas para contrarrestar el estrés causado por frío y/o por congelación-descongelación y panorama de tolerancia de las rizobacterias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/9255>

Rojas-Sánchez, B., Guzmán-Guzmán, P., Morales-Cedeño, L. R., Del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Saucedo-Martínez, B. C., Sánchez-Yáñez, J. M., Fadiji, A. E., Babalola, O. O., Glick, B. R., & Santoyo, G. (2022). Bioencapsulation of Microbial Inoculants: Mechanisms,

Formulation Types and Application Techniques. *Applied Biosciences*, 1(2), 198-220. <https://doi.org/10.3390/applbiosci1020013>

Rosete-Enríquez, M., Juárez-González, V.R., Escobar-Muciño, E. *et al.* Surviving desiccation: key factors underlying tolerance in prokaryotes and eukaryotes. *Protoplasma* (2025). <https://doi.org/10.1007/s00709-025-02134-1>

Ryan, M. J., Smith, D., & Jeffries, P. (2000). Cryopreservation of fungi. *Mycological Research*, 104(1), 1–11. <https://doi.org/10.1017/S0953756299001237>

Santelices S., C & Castro F., J. 2020 Preservación de microorganismos de liofilización. Chillan: Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias, no. 428. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/67166>

Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, Ma. del C., & Govindappa, M. (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science and Technology*, 22(8), 855–872. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.694413>

Senaratne, W. M. T. N., & Jayaweera, J. A. A. S. (2024). Comparison of microbial preservation methods: a narrative review. *GERMS*, 14(4), 375-386. <https://doi.org/10.18683/germs.2024.1447>

Sharma, M., Bhardwaj, R., Saran, M., Prajapat, R.K., Sharma, D., Mathur, M. (2023). Secondary Metabolites and Bioprospecting. In: Mawar, R., Sayyed, R.Z., Sharma, S.K., Sattiraju, K.S. (eds) Plant Growth Promoting Microorganisms of Arid Region. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-19-4124-5_12

Smith, D., & Onions, A. H. S. (1994). *The preservation and maintenance of living fungi* (2nd ed.). CAB International.

Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2016). *Principles of fermentation technology* (3rd ed.). Butterworth-Heinemann.

Sun, W. & Luo, Y. (2025). Eficacia de los alcoholes de azúcar y azúcares en la estabilización de proteínas durante la congelación, liofilización y secado al aire. *Medicina de la Zona Frígida*, 5(2), 65-72. <https://doi.org/10.1515/fzm-2025-0007>

Tapia, H., Young, L., Fox, D., Bertozzi, C. R., & Koshland, D. (2015). Increasing intracellular trehalose is sufficient to confer desiccation tolerance to *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 112(19), 6122-6127. <https://doi.org/10.1073/pnas.1506415112>

Teramoto, N., Sachinvala, N. D., & Shibata, M. (2008). Trehalose and Trehalose-based Polymers for Environmentally Benign, Biocompatible and Bioactive Materials. *Molecules*, 13(8), 1773-1816. <https://doi.org/10.3390/molecules13081773>

- Tilman, D., Balzer, C., Hill, J., & Befort, B. L. (2011). Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 108(50), 20260-20264. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116437108>
- Vassilev, N., Vassileva, M., Martos, V., Del Moral, L. F. G., Kowalska, J., Tylkowski, B., & Malusá, E. (2020). Formulation of Microbial Inoculants by Encapsulation in Natural Polysaccharides: Focus on Beneficial Properties of Carrier Additives and Derivatives. *Frontiers In Plant Science*, 11, 270. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00270>
- Vivanco-Calixto, R., Molina-Romero, D., Morales-García, Y. E., Quintero-Hernández, V., Munive-Hernández, A., Baez-Rogelio, A., & Muñoz-Rojas, J. (2016). Reto agrobiotecnológico: inoculantes bacterianos de segunda generación. *Zenodo (CERN European Organization For Nuclear Research)*. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5069043>
- Wang, X., Cole, C. G., DuPai, C. D., & Davies, B. W. (2020). Protein Aggregation is Associated with *Acinetobacter baumannii* Desiccation Tolerance. *Microorganisms*, 8(3), 343. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030343>
- Wankhade, A., Wilkinson, E., Britt, D. W., & Kaundal, A. (2025). A Review of Plant–Microbe Interactions in the Rhizosphere and the Role of Root Exudates in Microbiome Engineering. *Applied Sciences*, 15(13), 7127. <https://doi.org/10.3390/app15137127>
- Wessman, P., Håkansson, S., Leifer, K., & Rubino, S. (2013). Formulations for Freeze-drying of Bacteria and Their Influence on Cell Survival. *Journal Of Visualized Experiments*, 78. <https://doi.org/10.3791/4058>
- Wellington, E. M. H., Williams, S. T., & Thomas, C. M. (1992). Preservation of actinomycete inoculum in liquid nitrogen. *Journal of General Microbiology*, 138, 1711–1719
- Yang, P., Bokros, N., Debolt, S., Zhao, Z., & Xia, Y. (2022). Genome Sequence Source of *Bacillus amyloliquefaciens* Strain GD4a, a Bacterial Endophyte Associated with Switchgrass Plants. *Phytobiomes Journal*, 6(4), 354-357. <https://doi.org/10.1094/pbiomes-09-21-0054-a>
- Yang, P., Zhao, Z., Fan, J., Liang, Y., Bernier, M. C., Gao, Y., Zhao, L., Opiyo, S. O., & Xia, Y. (2023). *Bacillus proteolyticus* OSUB18 triggers induced systemic resistance against bacterial and fungal pathogens in *Arabidopsis*. *Frontiers In Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1078100>
- Yang, P., Condric, A., Scranton, S., Hebner, C., Lu, L., & Ali, M. A. (2024). Utilizing Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) to Advance Sustainable Agriculture. *Bacteria*, 3(4), 434-451. <https://doi.org/10.3390/bacteria3040030>
- Zhang, J., Cook, J., Nearing, J. T., Zhang, J., Raudonis, R., Glick, B. R., Langille, M. G., & Cheng, Z. (2021). Harnessing the plant microbiome to promote the growth of agricultural crops. *Microbiological Research*, 245, 126690. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126690>
- Zhang, T., Jian, Q., Yao, X., Guan, L., Li, L., Liu, F., Zhang, C., Li, D., Tang, H., & Lu, L. (2024). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) improve the growth and quality of several crops. *Heliyon*, 10(10), e31553. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e31553>

