



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

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

**Transcriptómica comparativa entre *Klebsiella variicola*
T29A y su mutante BetR sensible a desecación y
congelación-descongelación**

Maestría en Ciencias Microbiológicas

PRESENTA:

Biol. María Rosete Enríquez

**Tutora: Dra. Verónica Quintero Hernández
Cotutor: Dr. Víctor Rivelino Juárez González**

Laboratorio: Ecología Molecular Microbiana



Octubre 2020



Índice General

Índice General	II
Índice de Cuadros	III
Índice de Figuras	IV
Abreviaturas.....	VI
1. Resumen	1
1.1. Abstract	5
2. Introducción	2
3. Antecedentes	5
3.1. Generalidades sobre la tolerancia a la desecación	5
3.2. Estrategias utilizadas por los procariontes para tolerar la desecación	3
3.2.1. Adaptaciones conductuales.....	5
3.2.2. Adaptaciones fisiológicas al estrés hídrico	6
3.2.3. Adptaciones moleculares.....	8
3.3. Perfiles de expresión genética en diferentes bacterias anhidrobiontes o xerotolerantes	9
3.4. <i>Klebsiella variicola</i> cepa T29A tolerante a la desecación	19
3.5. <i>K. variicola</i> cepa mutante BetR sensible a la desecación	20
4. Justificación	20
5. Hipótesis	11
6. Objetivos	11
6.1. General	20
6.2. Particulares	20
7. Materiales y métodos	21
7.1. Cepas bacterianas y medios de cultivo.....	21
7.2. Ensayos de desecación ambiental	12
7.3. Purificación del ARN total	11
7.1. Microarreglos de ADN de dos canales	11
8. Resultados	14
8.1. Cinéticas de tolerancia y/o sensibilidad a la desecación de las cepas de <i>K. variicola</i> T29A y BetR.....	14
8.2. Efecto del tiempo de rehidratación en la tolerancia y/o sensibilidad de las cepas de <i>K. variicola</i> T29A y BetR sometidas a desecación	19
8.3. Análisis de la expresión genética en las cepas de <i>K. variicola</i> T29A y BetR sometidas a desecación ambiental	19
8.4. Comparación de los perfiles de expresión genética entre las cepas de <i>K. variicola</i> T29A y BetR sometidas a desecación.....	19
9. Discusión	23
10. Conclusiones	23
11. Literatura citada.....	
12. Anexos.....	19
12.1 Anexo 1: Composición de medios de cultivos MM9-Glucosa, LB y MacConkey	20
12.2 Anexo 2: Clasificación por anotación de los genes <i>Up</i> y <i>Down</i> regulados de la cepa T29A	20
12.3 Anexo 3: Categorización por anotación de los genes <i>Up</i> y <i>Down</i> regulados de la cepa BetR.....	20

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Tasa de supervivencia bacteriana (BSR) de las cepas de *Klebsiella variicola* T29A y BetR desecadas durante 18 días.

Cuadro 2. Tasa de supervivencia bacteriana (BSR) de las cepas de *Klebsiella variicola* T29A y BetR expuestas a desecación ambiental.

Cuadro 3. Tasa de supervivencia bacteriana (BSR) de cepas bacterianas desecadas por durante 18 días y rehidratadas por 20 minutos o 24 horas.

Cuadro 4. Clasificación por anotación de los genes *Up* regulados que se expresan en ambas cepas T29A y BetR posterior a la desecación ambiental de 12 días.

Índice de Figuras

Figura 1. Mecanismos adaptativos utilizados por bacterias anhidrobiontes o xerotolerantes.

Figura 2. Dominios conservados de la proteína BETR de la cepa mutante KvDSM6 sensible a la desecación.

Figura 3. Representación esquemática de la metodología empleada para los ensayos de desecación ambiental.

Figura 4. Controles de calidad durante el proceso de extracción de ARN total.

Figura 5. Control de pérdida de agua de las muestras antes y después de la desecación ambiental.

Figura 6. Recuperación en medio MM9-Glucosa de las cepas de *Klebsiella variicola* precultivadas/cultivadas en medio MM9.

Figura 7. Rescate en medio LB de las cepas de *Klebsiella variicola* precultivadas/cultivadas en medio MM9.

Figura 8. Representación gráfica de la tasa de supervivencia bacteriana (BSR) antes y después del estímulo por desecación/rehidratación a lo largo de 18 días.

Figura 9. Goteo en placa en medio MM9-Glucosa de bacterias precultivadas/cultivadas en medio LB y desecadas hasta 18 días.

Figura 10. Goteo en placa en medio LB de células bacterianas precultivadas/cultivadas en medio LB.

Figura 11. Gráfica de la tasa de supervivencia bacteriana (BSR) de células sin desecación y después de la desecación/rehidratación durante 18 días.

Figura 12. Recuperación en medio MacConkey de la cepa de *Klebsiella variicola* T29A desecada durante 18 días con rehidrataciones de 20 minutos y/o 24 horas.

Figura 13. Restablecimiento en medio MacConkey de la cepa de *Klebsiella variicola* BetR desecada durante 18 días con rehidrataciones de 20 minutos y/o 24 horas.

Figura 14. Representación gráfica de la tasa de supervivencia bacteriana (BSR) de las cepas de *Klebsiella variicola* T29A y BetR con rehidratación de 20 minutos (corta) y 24 horas (larga).

Figura 15. Imagen de microarreglos de ADN de las cepas de *Klebsiella variicola* T29A y BetR desecadas durante 12 días.

Figura 16 A. Clasificación por anotación de genes *Up* regulados de *Klebsiella variicola* T29A después de la desecación por 12 días.

Figura 16 B. Clasificación por anotación de genes *Down* regulados de *Klebsiella variicola* T29A después de la desecación por 12 días.

Figura 17. Representación gráfica de las agrupaciones por anotación de la cepa T29A desecada por 12 días.

Figura 18 A. Agrupaciones por anotación de genes *Up* regulados de *Klebsiella variicola* BetR después de la desecación por 12 días.

Figura 18. Agrupaciones por anotación de genes *Down* regulados de *Klebsiella variicola* BetR después de la desecación por 12 días.

Figura 19. Categorización por anotación de genes *Up* y *Down* regulados de la cepa *Klebsiella variicola* BetR posterior a estrés por desecación durante 12 días.

Figura 20. Comparación de categorías por anotación de genes *Up* regulados de las cepas *Klebsiella variicola* T29A y BetR sometidas a desecación durante 12 días.

Figura 21. Expresión diferencial genes *Up* regulados en las cepas T29A y BetR sometidas a desecación por 12 días.

Figura 22. Expresión diferencial genes *Down* regulados en las cepas T29A y BetR sometidas a desecación por 12 días.

Abreviaturas

AD: antes de la desecación

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

BSR: tasa de supervivencia bacteriana

°C: grados Celsius

DO: densidad óptica

DPD: días posteriores a la desecación

g: gramos

h: horas

L: litros

µg: microgramos

µL: microlitros

mL: mililitros

mm: milímetros

nm: nanómetros

RT-qPCR: Transcripción inversa - Reacción de en Cadena de la Polimerasa en tiempo real

rpm: revoluciones por minuto

1. Resumen

La pérdida de agua hasta el equilibrio con el aire seco representa un estrés letal para la mayoría de los seres vivos que habitan el planeta tierra. Sin embargo, la existencia de organismos tolerantes a la desecación, anhidrobiontes y/o xerotolerantes que desafían esta condición pone de manifiesto la presencia de extraordinarias adaptaciones para sobrevivir al estado desecado (0.1 g de agua por gramo de masa seca). Dentro de los organismos tolerantes a la desecación encontramos bacterias que utilizan estrategias como la síntesis y acumulación de osmoprotectores, la reparación de ADN, cambios en la membrana plasmática, reestructuración del metabolismo y formación de biopelículas. Un modelo bacteriano comprobado para estudiar la tolerancia a la desecación es *Klebsiella variicola* cepa T29A, de la cual se ha obtenido una cepa mutante sensible a la desecación por la interrupción del gen *betR* que codifica para una proteína con dominio BetR. El estudio de la expresión genética global en estas dos cepas sería de gran relevancia, ya que proporcionaría evidencias sobre cuales genes cambian su expresión en las condiciones de tolerancia y sensibilidad a la desecación. Por tal razón, en el presente trabajo se efectuó un estudio de transcriptómica usando un sistema heterólogo de microarreglos de ADN diseñado con base a 4,608 genes del genoma completo de *Escherichia coli* cepa K-12. Para realizar este estudio primero se analizaron las condiciones de precultivo/cultivo y tiempos de rehidratación óptimos de los ensayos de desecación ambiental. Posteriormente, se realizaron dos microarreglos, uno para comparar la expresión genética de la cepa T29A antes y después de la desecación durante doce días y otro para contrastar la expresión genética en la cepa BetR antes y después de la desecación (doce días). Las imágenes de los microarreglos fueron analizadas con el programa Genarise obteniéndose listas de genes *Up* y *Down* regulados con los cortes de Z-Score de 1.5 y 2.0. Los análisis bioinformáticos se ejecutaron en la plataforma David (<https://david.ncicrf.gov>) solamente para las listas de genes con Z-Score de 2.0. Se demostró que la cepa tolerante T29A sometida a desecación durante doce días tiene 135 genes *Up* regulados y 113 genes *Down* regulados. Por su parte, la cepa BetR desecada mostró 141 genes *Up* regulados y 60 genes *Down* regulados. La clasificación de genes por anotación reveló que en la cepa T29A los genes *Up* regulados básicamente codifican para proteínas de membrana involucradas en el transporte (aminoácidos, glutatión, azúcares y hemo), en actividades enzimáticas (oxidorreducción, transferasas de acilo, sintasas de ácidos grasos) y proteínas de membrana externa (porinas y chaperonas). También se determinó que hay un incremento en la expresión de genes implicados en el metabolismo de azúcares (glucólisis/gluconeogénesis), carbono (acetil-CoA), hierro/azufre (hemo, proteínas Fe/S). Además, genes que forman parte de los sistemas de reparación al ADN (helicadas, reparación acoplada a transcripción), control transcripcional y respuestas al estrés oxidativo tienen una intensificación en su expresión. Los genes *Down* regulados están asociados con la división celular y algunas proteínas de membrana. Por otro lado, en la cepa BetR sensible a la desecación se determinó por anotación que dentro de los genes *Up* regulados están genes como *proW*, *betA* (betaína), *treA* (trehalosa), *soxS* y *sodA*. Así mismo, la sensibilidad a la desecación

puede deberse a una disminución en la expresión de genes involucrados en la síntesis de proteínas, componentes estructurales de los ribosomas y reciclaje de ribosomas estancados por ARNm dañado. También, al descenso en la expresión de genes que participan en la reparación de ADN (*uvrB* y *ytfA*) y aumento en la expresión de polimerasa propensa a error (*umuC*). Así como, a la caída en la expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés osmótico. Por lo tanto, se concluye que el gen *betR* que codifica para un regulador transcripcional de la familia HRH-XRE tiene un papel fundamental en la expresión del fenotipo de tolerancia en la desecación y al estar interrumpido en la cepa sensible a desecación puede afectar la regulación de diversos genes de manera global.

1.1 Abstract

The loss of water to equilibrium with dry air represents a lethal stress for most of the living beings that inhabit planet earth. However, existence of organisms tolerant to desiccation, anhydrobionts and/or xerotolerant that defy this condition reveals the presence of extraordinary adaptations to survive the desiccated state (0.1 g of water per gram of dry mass). Within the organisms tolerant to desiccation find bacteria that use strategies such as the synthesis and accumulation of osmoprotectors, DNA repair, changes in the plasma membrane, metabolism restructuring and biofilm formation. A bacterial model proved for studying desiccation tolerance is *Klebsiella variicola* strain T29A, from which a mutant strain sensitive to desiccation has been obtained by disrupting the *betR* gene that encodes a protein with BetR domain. The study of global gene expression in these two strains would be of great relevance, since it would provide evidence on which genes change their expression under conditions of tolerance and sensitivity to desiccation. For this reason, in the present work a transcriptomic study was carried out using a heterologous system of DNA microarrays designed based on 4,608 genes of the complete genome of *Escherichia coli* strain K-12. To carry out this study, the preculture/culture conditions and optimal rehydration times of the environmental desiccation assay were first analyzed. Subsequently, two microarrays were made, one to compare the genetic expression of T29A strain before and after desiccation for twelve days and another to contrast the gene expression of BetR strain before and after desiccation (twelve days). The images of microarrays were analyzed with the Genarise program, obtaining lists of Up and Down genes regulated with the Z-Score cuts of 1.5 and 2.0. Bioinformatics analyzes were performed on David platform (<https://david.ncifcrf.gov>) only for gene lists with a Z-Score of 2.0. The tolerant strain T29A desiccated for twelve days was shown to have 135 Up regulated genes and 113 Down regulated genes. For its part, the desiccated BetR strain showed 141 Up regulated genes and 60 Down regulated genes. The classification of genes by annotation revealed that in T29A strain, Up

regulated genes basically code for membrane proteins involved in transport (amino acids, glutathione, sugars and heme), in enzymatic activities (redox, acyl transferases, fatty acid synthases) and outer membrane proteins (porins and chaperones). Also, was determined that is an increase in the expression of genes implicated in metabolism of sugars (glycolysis / gluconeogenesis), carbon (acetyl-CoA) and iron/sulfur (heme, Fe / S proteins). In addition, genes that are part of DNA repair systems (helicases, transcription-coupled repair), transcriptional control and responses to oxidative stress have an intensification in their expression. Down regulated genes are associated with cell division and some membrane proteins. Moreover, in BetR strain sensitive to desiccation, it was determined by annotation that genes Up regulated were *proW*, *betA* (betaine), *treA* (trehalose), *soxS* and *sodA*. Futhermore, the sensitivity to desiccation may be due to a decrease in the expression of genes involved in the synthesis of proteins, structural components of ribosomes and recycling of ribosomes stalled by damaged mRNA. Also, a decrease in the expression of genes that participate in DNA repair (*uvrB* and *ytfA*) and an increase in the expression of error prone polymerase (*umuC*). As well as, the fall in the expression of genes related to the response to osmotic stress. Therefore, it is concluded that *betR* gene that codes for a transcriptional regulator of the HRH-XRE family has a fundamental role in the expression of phenotype of tolerance to desiccation and being interrupted in the strain sensitive to desiccation may affect regulation of various genes globally.

2. Introducción

De todas las formas de vida residentes del planeta tierra que naturalmente toleran condiciones estresantes, en primer lugar, tenemos a los procariontes que poseen una gran diversidad de poderosas adaptaciones que les permiten hacer frente a las variaciones extremas del medio ambiente. Algunas de las principales condiciones que las bacterias soportan se encuentran la limitación de agua, las fluctuaciones en la temperatura, los valores extremos de pH, elevadas concentraciones de sales y la exposición a radiación ultravioleta (Horikawa *et al.*, 2008; Rodríguez-Andrade *et al.*, 2018). Resaltando la primera condición, se conoce que las bacterias responden a la pérdida del agua mediante cambios globales en los patrones de transcripción y traducción de manera coordinada temporal y espacialmente para sobrevivir en ambientes extremos tendientes a la desecación (Lebre *et al.*, 2017).

Sin embargo, la tolerancia a la desecación aparte de ser una capacidad que presentan por excelencia los organismos procariotas también es una característica ampliamente distribuida a lo largo de la escala evolutiva. Se ha demostrado que la tolerancia a la desecación se ha diversificado en organismos filogenéticamente distanciados como los tardígrados, nematodos, quistes de crustáceos, levaduras y plantas inferiores y superiores (Crowe *et al.*, 1997; Alpert 2005; Calahan *et al.*, 2011). A todo este grupo de organismos que tienen la capacidad de sobrevivir al estado desecado se les ha denominado colectivamente como anhidrobiontes o xerotolerantes, los cuales, han sido ampliamente utilizados como modelos de estudio para comprender los mecanismos moleculares, bioquímicos y fisiológicos que permitirían descifrar las vías reguladoras de la biología anhidra que conducen a esta ventaja adaptativa (Potts, 2001; Leprince y Buitink, 2010). Del mismo modo, la investigación sobre los mecanismos de la tolerancia a la desecación ha proporcionado resultados prometedores para diseñar estrategias biotecnológicas que confieran tolerancia a la desecación a organismos sensibles a este factor estresante (Billi y Potts, 2002).

Por lo anterior, el estudio de la tolerancia y sensibilidad a condiciones extremas se está enfocando desde la visión post-genómica para abarcar de manera masiva la identificación de genes, productos genéticos y vías regulatorias que han moldeado la resistencia o la susceptibilidad a la desecación (Potts *et al.*, 2005; Cytryn *et al.*, 2007; Pippin *et al.*, 20017; Cui *et al.*, 2017).

3. Antecedentes

3.1 Generalidades sobre la tolerancia a la desecación

El agua ha sido considerada como la “matriz de la vida” ya que sin ella la vida prácticamente no existiría (Szent-Gyorgyi, 1956). Sin embargo, más allá conceptualizar al agua como el solvente para los movimientos de las macromoléculas biológicas, el agua tiene funciones estructurales y dinámicas que condicionan las interacciones biomoleculares. El agua es además una fuerza esencial que dicta las conformaciones y asociaciones macromoleculares, ayuda en los procesos químicos y de transferencia de información en las células, actúa como nucleófilo reactivo, es donante y aceptora de protones, media interacciones electrostáticas y presenta cambios abruptos o en fase para cumplir funciones biológicas (Ball, 2017). Por lo tanto, es innegable que el agua es indispensable para la supervivencia de todos los seres vivos de la tierra, ya que es esencial para la estructura, la estabilidad y la dinámica de los ácidos nucleicos, las proteínas y las membranas biológicas. En consecuencia, la eliminación de agua de un organismo provoca un estrés muy grave que a menudo es letal (Alpert, 2006; Leprince y Buitink, 2015). La pérdida de agua que ocurre a 25 °C y a una humedad relativa (HR) menor al 50% ha sido considerada como la condición más severa en la que los organismos pierden totalmente el agua hasta alcanzar 0.1 g de agua por gramo de masa seca, sufriendo un proceso de desecación extrema (Potts, 1994; Billi y Potts, 2002; Alpert, 2005; Muñoz-Rojas, 2011). En esta condición los organismos sufren graves daños como la fragmentación o reordenamiento del ARN y ADN, las proteínas pierden su

conformación tridimensional y las membranas cambian a una fase en donde se pueden fusionar (Leprince y Buitink, 2015).

Por lo mencionado anteriormente, los organismos sometidos a desecación sufren un estrés hídrico sumamente severo que llevaría a dos posibles respuestas: adaptarse o morir. De hecho, es muy frecuente considerar que la mayoría de los seres vivos no pueden adaptarse a la pérdida de agua por desecación y por ende mueren instantáneamente (Alpert, 2005). Sin embargo, se ha encontrado que existen diversos taxones tolerantes a la desecación incluyendo plantas, invertebrados, hongos, algas, líquenes, esporas y bacterias. Todos estos organismos (anhidrobiontes) son tolerantes a la desecación ya que tienen la capacidad para sobrevivir a una deshidratación casi absoluta y mantenerse con vida en una animación suspendida durante largos períodos de tiempo, sin que se presenten daños irreversibles que cause la muerte para poder posteriormente reanudar su función normal con la rehidratación (Alpert y Oliver, 2002).

Para sobrevivir a la desecación los organismos tolerantes implementan mecanismos estructurales, fisiológicos y moleculares que les permiten sobrevivir al grave déficit hídrico. De manera general, los dispositivos de tolerancia de los anhidrobiontes o xerotolerantes consisten en elegantes sistemas que se coordinan durante la desecación para regular el reemplazo del agua que rodea a las macromoléculas por trehalosa y sacarosa (Crowe, 1971; 2007) formando citoplasmas vítreos (Green y Angell, 1988), la modificación y la estabilización de proteínas y lípidos de membrana (Crowe y Crowe, 1992; Leslie *et al.*, 1995), la expresión de acuaporinas y proteínas LEA (Tanghe *et al.*, 2006; Hand *et al.*, 2011), la síntesis de exopolisacáridos que forman cápsulas protectoras (Vanderlinde *et al.*, 2010), la producción de pigmentos fotoreactivos, osmoprotectores, antioxidantes y destoxicantes (Baliarda *et al.*, 2003, Matallana-Surget *et al.*, 2012), la modificación de la morfología colonial y el control transcripcional de genes (Potts, 1994) (Fig. 1).

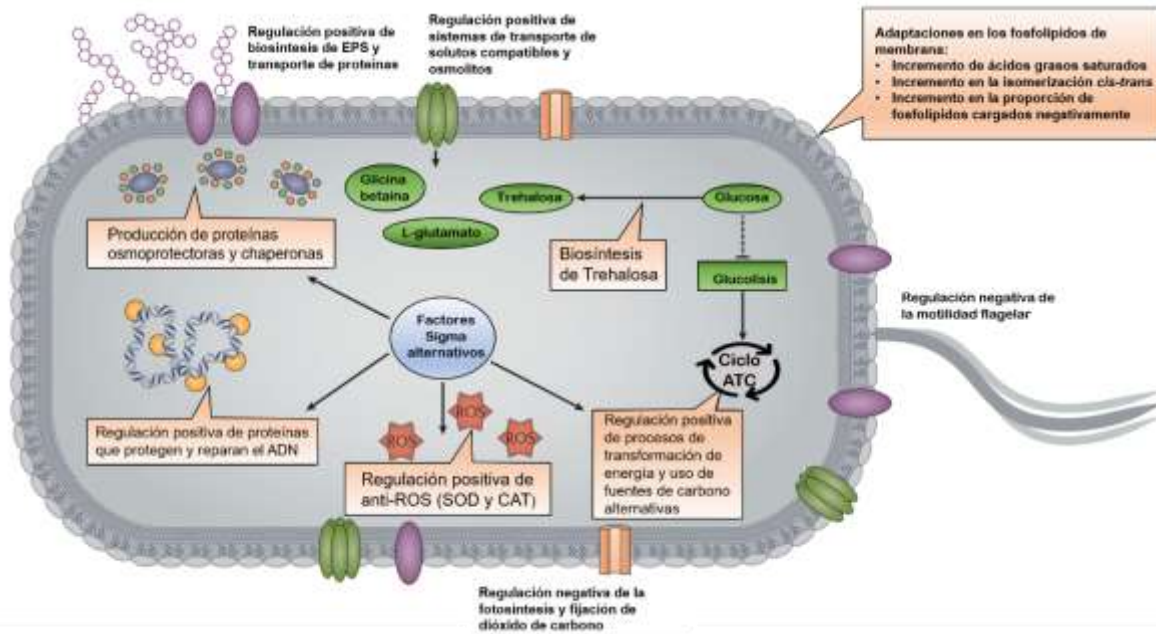


Figura 1. Mecanismos adaptativos utilizados por bacterias anhidrobiontes o xerotolerantes. En general, las bacterias resisten la desecación previniendo la pérdida de agua y aumentando su detención. Se protege al ADN y a las proteínas mediante la acumulación y expresión de osmoprotectores. El consumo energético disminuye, preservando la energía disponible y se reprimen los procesos que consumen energía. También, se evita la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que dañan en el ADN durante la desecación. La pérdida de agua desencadena la acumulación de solutos y sales compatibles que reemplazan el agua como macromoléculas y estabilizadores de membrana. Las modificaciones de fosfolípidos hacen que la membrana celular sea más capaz de retener agua intracelularmente. Asimismo, las sustancias poliméricas extracelulares secretadas (EPS) forman una biopelícula protectora que protege a las células bacterianas del estrés abiótico y absorbe agua. Imagen modificada de Lebre *et al.*, (2017).

3.2 Estrategias utilizadas por los procariontes para tolerar la desecación

La tolerancia a la desecación implica secarse sin morir, mediante sistemas de protección que incluyen el reemplazo del agua por azúcares, proteínas que estabilizan macromoléculas y membranas, síntesis de antioxidantes que contrarrestan el daño por especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*), entre muchos otros mecanismos. Para comprender mejor todas las estrategias utilizadas por las bacterias para tolerar la desecación se ha propuesto agruparlas en tres tipos de respuestas: Adaptaciones conductuales, adaptaciones fisiológicas al estrés hídrico y adaptaciones moleculares (Lebre *et al.*, 2017). A continuación, se explicarán detalles de los diferentes mecanismos adaptativos más utilizados por los procariontes anhidrobiontes para solucionar la pérdida de agua en condiciones extremas y por lo tanto tolerar la desecación.

3.2.1 Adaptaciones conductuales

Una respuesta común de los procariontes a la pérdida del agua es entrar en un estado de dormancia reversible, en donde las células disminuyen considerablemente su metabolismo para reanudarlo en cuanto las condiciones sean favorables (Rittershaus *et al.*, 2013). En algunas bacterias del género *Bacillus* y *Clostridium* la dormancia implica la formación de esporas altamente resistentes a una plétora de agentes estresantes abióticos y bióticos. Al respecto, se conoce que las esporas son resistentes a la desecación debido a que intracelularmente acumulan ácido dipicolínico (DPA) y proteínas pequeñas solubles en ácido, de tipo α y/o tipo β (SASPs) para proteger física y químicamente a su ADN del daño oxidativo (Setlow, 2016). Además, para el caso de las bacterias que no pueden formar esporas se ha descubierto otra forma de dormancia de tipo metabólica en la cual se entra a un estado viable no cultivable. Bacterias como *Salmonella enterica*, *Legionella pneumophila* y *Sinorhizobium meliloti* usan como estrategia el estado viable no cultivable para disminuir su actividad metabólica y persistir ante la pérdida de agua por largos períodos de tiempo (Dworkin y Shah, 2010; Vriezen *et al.*, 2012).

Otra adaptación conductual es la formación de exopolisacárido (EPS) y biopelículas que contribuyen en la formación de cubiertas protectoras o intrincadas mallas que protegen a las comunidades microbianas de la desecación (Flemming *et al.*, 2016). Debido a las propiedades hidrofílicas del ESP las células desecadas pueden sobrevivir mediante una rápida absorción del agua y restauración de las actividades celulares cuando las células son rehidratadas. Por ejemplo, *Pseudomonas putida* produce en exceso alginato aniónico después de ser sometida a estrés hídrico, lo que favorece la retención de agua (Chang *et al.*, 2007). Más aún, se ha demostrado por medio de análisis de transcriptómica que *Listeria monocytogenes*, *Cronobacter salazakii* y *Bradyrhizobium japonicum* son tolerantes a la desecación debido a la sobre expresión de genes implicados en la formación de biopelículas (Truelstrup *et al.*, 2009; Du *et al.*, 2018; Cytryn *et al.*, 2007).

3.2.2 Adaptaciones fisiológicas al estrés hídrico

Dentro de las respuestas de vital importancia para sobrevivir a la desecación está la modificación de la membrana citoplasmática, ya que es necesario evitar que sufra daños y se pierda la integridad celular. Se conoce que las bacterias sometidas a desecación aumentan la proporción de ácidos grasos insaturados, ácidos grasos *cis*-monoinsaturados y ácidos grasos de ciclopropano en sus membranas citoplasmáticas (Mutnuri *et al.*, 2005). Estos cambios inducen un estado más desordenado de la membrana y disminuye la permeabilidad a protones que equilibran el pH interno para estabilizar las proteínas intracelulares (Kocharunchitt *et al.*, 2014). Otras bacterias aumentan la cantidad de fosfatidilglicerol y cardiolipina para asegurar la preservación de la integridad de la bicapa de su membrana citoplasmática y de las proteínas de membrana que regulan la acumulación de osmolitos (Romantsov *et al.*, 2009).

Por otra parte, se ha considerado que el secreto de la tolerancia a la desecación está en la acumulación intracelular de solutos compatibles como los disacáridos (trehalosa y sacarosa) o los aminoácidos junto con sus derivados (prolina, ectoína y glicina betaína), los cuales pueden ser sintetizados *de novo* o adquiridos del medio ambiente (Potts, 2001; Santos *et al.*, 2002; Crowe, 2007). Al respecto, se cree que las bacterias consideradas como anhidrobiontes usan una estrategia bifásica para responder con adaptaciones fisiológicas a la desecación. Este proceso involucraría una acumulación rápida de solutos cargados (potasio o glutamato) para responder inmediatamente al estrés osmótico y posteriormente reemplazarlos por solutos orgánicos compatibles como los disacáridos (trehalosa, sacarosa, maltosa) que evitan la desestabilización de la membrana y vitrifican el citoplasma. De esta manera, las células sometidas a la desecación acumulan en su interior sustancias protectoras que proporcionan un balance osmótico a largo plazo y la estabilización de las proteínas y lípidos de membrana citoplasmática (Crowe *et al.*, 1998).

A sí mismo, en las células desecadas se tiene que llevar a cabo un dramático cambio metabólico, ya que la eliminación casi total del agua del interior celular implica que las tasas de recambio de macromoléculas, las cinéticas metabólicas,

las vías de transformación de energía y el crecimiento celular se ven extensamente afectadas y alteradas (Finn *et al.*, 2013). Por lo tanto, como medida general para contener ante tales cambios las bacterias tolerantes a la desecación disminuyen considerablemente las rutas anabólicas y por ende evitan la producción de ROS. También, se inducen las rutas catabólicas como la glucólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, el ciclo del glioxilato, la fosforilación oxidativa y oxidación de ácidos grasos para obtener la energía necesaria para la supervivencia (Riedel y Lehner, 2002; Deng *et al.*, 2012).

3.2.3 Adaptaciones moleculares

Un mecanismo molecular de gran relevancia para soportar el estado desecado es la expresión de proteínas abundantes de la embriogénesis tardía (LEA, del inglés “Late Embryogenesis Abundant”), originalmente descritas en la maduración tardía de semillas de plantas sometidas a estrés hídrico (Xu *et al.*, 1996). Aunque las proteínas LEA fueron identificadas en plantas estas tienen su contraparte homóloga en bacterias, arqueas y hongos, sobre todo las proteínas LEA de la familia 3 que están fuertemente vinculadas a la tolerancia a la desecación (Garay-Arroyo *et al.*, 2000). La razón por la que las proteínas LEA actúa como protectores se debe a que tienen un alto contenido de glicina y un esqueleto altamente hidrofílico que les permite permanecer en un estado enrollado no estructurado cuando las condiciones de hidratación son normales. Pero, cuando se presenta la condición de desecación las proteínas LEA cambian a una estructuración ordenada e interactúan con muchas proteínas y el ADN, para proporcionarles un ambiente hidrofílico alrededor de ellas para compensar la pérdida de agua e inhibir la agregación molecular (Chakrabortee *et al.*, 2007).

Además, existen muchas otras proteínas que participan en la tolerancia a la desecación en organismos procariontes. Por ejemplo, se ha demostrado que *Microcoleus vaginatus* eleva la expresión de genes que codifican para las chaperonas moleculares GroES, GroEL, DnaJ y DnaK después del estrés por deshidratación. Así como la sobreproducción de proteínas de estrés oxidativo, como catalasas que contienen manganeso y tiorredoxinas, proteínas protectoras de ADN

y superóxido dismutasas (Shirkey *et al.*, 2007). En otras bacterias como *S. enterica* y *Escherichia coli* se ha demostrado que la desecación, activa la expresión de factores sigma alternativos implicados en la regulación positiva del regulador de estrés maestro *rpoS*. A su vez, el producto genético RsoS controla la expresión del regulón que contiene al gen que codifica para la proteína Dps que protege al ADN, a los genes *otsAB* de biosíntesis de trehalosa y algunos genes de respuesta a daños oxidativos (Finn *et al.*, 20013).

3.3 Perfiles de expresión genética en diferentes bacterias anhidrobiontes o xerotolerantes.

Como se ha mencionado la falta de agua en el ambiente es uno de los obstáculos más fuertes para la supervivencia de cualquier ser vivo, ya que la mayoría de los organismos mueren rápidamente al equilibrar su contenido de agua con el aire que los rodea. La pérdida de agua presupone daños graves e imposibles de reparar ya que las células desecadas presentan tensiones estructurales, fisiológicas y bioquímicas. No obstante, existen organismos que pueden tolerar la falta de agua y desecarse completamente sin sufrir daños, para luego comenzar de nuevo cuando son rehidratados (Alpert, 2006). Por lo tanto, la tolerancia a la desecación es una propiedad notable de los organismos anhidrobiontes o xerotolerantes que necesita ser estudiada detalladamente para determinar los diversos aspectos celulares, bioquímicos y moleculares implicados en las poderosas y diversas estrategias para contender con el estado desecado. Por tal razón, el estudio de la biología de la desecación ha recibido particular atención desde el 370 DC hasta la actualidad (Alpert, 2005). A lo largo de todo este tiempo, la forma de estudiar la tolerancia o sensibilidad a la pérdida de agua extrema ha cambiado de acuerdo con los avances tecnológicos y científicos de determinadas épocas. Al respecto, desde el descubrimiento del ADN como molécula portadora de la información genética, de la secuenciación del material genético y del desarrollo de la bioinformática, la identificación de genes ha sido un aspecto fundamental para comprender los procesos biológicos, y la tolerancia a la desecación no ha sido la excepción. Por ejemplo, se ha encontrado que genes con funciones reguladoras (*relA*, *rpoE2* y *hpr*)

y reparación de ADN (*uvrC*) desempeñan una función importante en la resistencia a desecación de *Sinorhizobium meliloti* (Humann *et al.*, 2009). Por otra parte, el gen de biosíntesis de trehalosa (*treS*) se ha relacionado con la tolerancia a desecación de *Bradyrhizobium japonicum* (Sugawara *et al.*, 2010). Dentro de los genes involucrados en la resistencia a desecación y estrés osmótico de *Listeria monocytogenes* encontramos los genes implicados en biosíntesis de flagelo (*fliP*, *fliB*, *flgD*, *flgL*), control de motor del flagelo (*motB*, *fliM*, *fliY*), biosíntesis de lípidos de membrana, producción de energía, incorporación de potasio y virulencia (Hingston *et al.*, 2015). Además, se ha encontrado que la disrupción de los genes *lea1* y *lea2* que codifican para las proteínas LEA, disminuye la tolerancia de *Azotobacter vinelandii* a las condiciones anhidras (Rodríguez-Salazar *et al.*, 2017).

Por otra parte, la transcriptómica ha sido una herramienta muy utilizada para comprender de manera global las ventajas biológicas conferidas por la capacidad de sobrevivir en estado de desecación (Kato *et al.*, 2004). Referente a los estudios de los transcriptomas, se ha revelado que *Acinetobacter baumannii* responde a las condiciones de desecación/rehidratación aumentando la expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con la resistencia antimicrobiana, bombas de extrusión y *quorum quenching* (inhibición de las señales que conducen al *quorum sensing*) (Gayoso *et al.*, 2014). En *B. japonicum*, mediante el uso de análisis por microarreglos del estado desecado se encontró una regulación positiva y negativa de proteínas hipotéticas (27%) y de reguladores transcripcionales (9%). Pero, de manera más relevante se encontró una sobreexpresión de genes involucrados en el metabolismo de trehalosa, reparación de ADN, actividad de chaperonas, transferencia de energía y protección contra el estrés oxidativo (Cytryn *et al.*, 2007). En *P. putida* KT2440 se ha observado el aumento en la expresión de genes de síntesis de alginato y flagelo (Gulez *et al.*, 2012). En *S. enterica* quedó demostrado que se presenta un aumento en la expresión de genes involucrados en rutas metabólicas, regulación de transportadores, reparación y replicación del ADN, transcripción, traducción y virulencia (Maserati *et al.*, 2017). Asimismo, en *Rhodococcus jostii* RHA1 se encontró la regulación positiva de algunos genes

implicados en la protección bajo estrés oxidativo (*dps1*) y genes que codifican para factores sigma SigF1 y SigF3. De hecho, se ha sugerido que SigF1 y SigF3 podrían regular genes involucrados en la resistencia a una amplia gama de situaciones de estrés (tratamientos de inanición, sal y calor), mediante su participación en la red de activación de otros factores sigma alternativos y del mismo gen *dps1* (LeBlanc *et al.*, 2008).

3.4 *Klebsiella variicola* cepa T29A tolerante a la desecación

En el presente trabajo se utilizó a *K. variicola* T29A como organismo modelo para estudiar los perfiles de expresión genética presentes durante un estímulo estresante como la desecación ambiental. *K. variicola* es un bacilo Gram negativo no móvil que puede crecer en medio LB, MacConkey, Koser Citrate, YM y PY. Forma colonias en medio MacConkey en aproximadamente un día. No fermenta adonitol (característica distintiva de *K. pneumoniae*), pero fermenta ramanosa. Crece a 37°C y a pH 5.6 - 7. Son abundantes en plantas y fijan nitrógeno. Representan menos del 10% de aislados clínicos de *Klebsiella* que previamente fueron considerados como *K. pneumoniae*. Las cepas de *K. variicola* son susceptibles a ácido nalidíxico pero resistentes naturalmente a la ampicilina y carbenicilina aunque no en presencia del ácido clavulánico que inhibe a la penicilinasas. Algunas cepas son sensibles a gentamicina y estreptomina (Rosenblueth *et al.*, 2004).

Específicamente, *K. variicola* T29A fue aislada de caña de azúcar y tiene actividad de bacteria promotora del crecimiento (PGPR) mediante la producción de ácido indol-acético (Silvana *et al.*, 2006). Además, se ha demostrado que la cepa de *K. variicola* T29A es tolerante a la desecación ambiental y que aún en estado desecado conserva sus propiedades de adherencia y colonización de plantas de maíz para promover el crecimiento vegetal (Muñoz-Rojas *et al.*, 2008, Pazos-Rojas *et al.*, 2018). Además, en el laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del CICM se ha construido un banco de mutantes de *K. variicola* T29A, siguiendo la estrategia de mutagénesis al azar mediante la inserción del transposón miniTn5Km. En ese trabajo se monitoreó la pérdida de tolerancia de 1000 mutantes que se sometieron

a estrés por desecación ambiental a 30 °C y 50% humedad relativa durante 18 días, encontrándose que 15 mutantes fueron muy sensibles a la desecación/rehidratación ya que su tasa de supervivencia bacteriana disminuyó considerablemente. La identificación de los genes mutados en las mutantes sensibles a la desecación/rehidratación indicó que estos codifican para proteínas que participan en diversos procesos que van desde actividades enzimáticas (monooxigenasa, nitrogenasa, acetiltransferasa, dihidroorotasa, ATPasa secretora y glutamato sintasa), para transporte (proteína exportadora de solutos), funciones estructurales (proteína formadora de pilus y formadora de exopolisacárido) y proteínas reguladoras de la expresión génica (activador del operón *cadC* y un regulador del operón arabinosa) (Corral-Lugo, 2010). Así mismo, se demostró que la cepa silvestre T29A y 9 cepas intolerantes a desecación obtenidas de la banca de mutantes de Corral-Lugo (2010) son resistentes a otros agentes estresantes como la congelación/descongelación extrema y al estrés osmótico por NaCl. Estos resultados demostraron que los genes interrumpidos en estas 9 cepas mutantes sensibles a desecación/rehidratación son específicos para la resistencia a la desecación. Sin embargo, la mutante KvDSM6 sensible a la desecación/rehidratación resultó intolerante a la congelación/descongelación y poco susceptible al estrés osmótico por NaCl, indicando una posible relación entre los genes implicados en la respuesta a diferentes factores estresantes como la desecación/rehidratación, la congelación/descongelación y la presión osmótica (Rodríguez-Andrade, 2011).

3.5 *K. variicola* cepa mutante BetR sensible a la desecación

La caracterización de la cepa mutante KvDSM6 sensible a desecación y congelación ha sido previamente estudiada por Rodríguez-Andrade (2019). En este estudio se encontró que la cepa KvDSM6 mutada por la inserción azarosa del transposón miniTn5Km tiene una curva de crecimiento similar a la cepa silvestre de *K. variicola* T29A, con un inicio de fase estacionaria después de las 9 horas de crecimiento en medio Luria Bertani (LB) y con un tiempo de generación de 1.55 horas diferente al de la cepa silvestre de 1.41 horas. Además, se demostró que la

cepa mutante KvDSM6 puede solubilizar fosfatos al igual que la cepa silvestre, sin embargo, produce una cantidad considerablemente menor de indoles y tiene una mayor producción de sideróforos con respecto a la cepa T29A (Rodríguez-Andrade, 2019). Por otra parte, se ha identificado mediante la estrategia de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés “*Polymerase Chain Reaction*”) arbitraria, y posterior secuenciación de los productos amplificados, que en la mutante KvDSM6 el transposón miniTn5Km interrumpe un gen que codifica para una proteína con dominio BetR. Así mismo, se ha demostrado que la complementación en *trans* de la cepa KvDSM6 con el gen completo aumenta de manera significativa la tolerancia a la desecación, indicando la relevancia que tiene este gen y su producto biológico en la supervivencia de *K. variicola* T29A en condiciones de desecación. No obstante, la cepa complementada no posee un fenotipo de resistencia a las condiciones de congelación/descongelación y estrés osmótico característicos de la cepa silvestre, sugiriendo que la relación del gen que codifica para una proteína con dominio BetR con otros genes debe ser un proceso altamente regulado (Rodríguez-Andrade *et al.*, 2019).

Mediante un análisis de BLASTN de la secuencia del gen *betR* (MK085750.1) interrumpido en la cepa KvDSM6, se obtuvieron alineamientos significativos de la totalidad de la información con una identidad entre el 100% y 95.6% para 14 secuencias del género *Klebsiella* que codifican para proteínas identificadas como proteínas con dominio BetR y 1 secuencia para *Serratia marcescens* que codifica para una proteína receptora reguladora de respuesta. Además, el BLASTP de la secuencia proteica (AYO90681.1) deducida del gen *betR* proyectó alineamientos significativos con la totalidad de la secuencia (281 aminoácidos) de 100% a 97.5% de identidad con proteínas anotadas como reguladores de respuesta fundamentalmente para especies del género *Klebsiella* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Al respecto, en la base de datos de dominios conservados CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) se indica que el dominio BetR (pfam 08667) incluye un motivo estructural amino terminal (N-terminal) hélice-giro-hélice (HTH, por sus siglas en inglés *helix-turn-helix*) y

pertenece a la superfamilia cl22854 (HTH-XRE) de proteínas de unión al ADN procariontas de la familia de reguladores transcripcionales de elementos de respuesta xenobiótica (*Helix-turn-helix XRE-family like proteins*). Además, en la base de datos InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) se establece que BetR es uno de los muchos reguladores de respuesta que está codificado principalmente en *Burkholderia* spp. Es un dominio N-terminal *helix-turn-helix* (HTH) y se ha demostrado que está relacionado con el dominio HTH de tipo XRE (IPR001387), se ha sugerido que BetR tendría dimerización, interacción proteína-proteína y propiedades de activación/alivio de inhibición. De acuerdo con la CDD las proteínas anotadas como reguladores de respuesta alineadas en el BLASTP también pertenecen a la superfamilia HTH-XRE (cl22854). La identificación de la secuencia del gen *betR* de la cepa KvDSM6 y de la secuencia proteica deducida en el genoma de *K. variicola* T29A NZ_CXPA00000000.1 (Martínez-Romero *et al.*, 2015), reveló la presencia de una secuencia de nucleótidos (NZ_CXPA01000028.1) y su correspondiente proteína definida como regulador de respuesta HTH-XRE (WP_072122817.1) con 100% de identidad y 100% de secuencia cubierta.

Por otra parte, la identificación de dominios conservados en la base CDD de la proteína derivada de la secuencia del gen *betR* mostró la presencia de una región HTH-XRE (cl22854) y un dominio REC (cd00159) (Fig. 2A). En el N-terminal de la proteína se ubica la región HTH-XRE a partir del aminoácido 11 al 136 teniendo una longitud de 126 aminoácidos y adyacentemente el dominio REC inicia en el aminoácido 161 a 263 con una longitud de 103 aminoácidos. También, en la región REC se localiza un sitio de reconocimiento intermolecular situado en la posición 210 a 215, un sitio de la interface de dimerización (unión a polipéptido) del aminoácido 262 al 264 y un sitio fosfoceptor en Asp 207 (Marchler, 2017) (Fig. 2B).

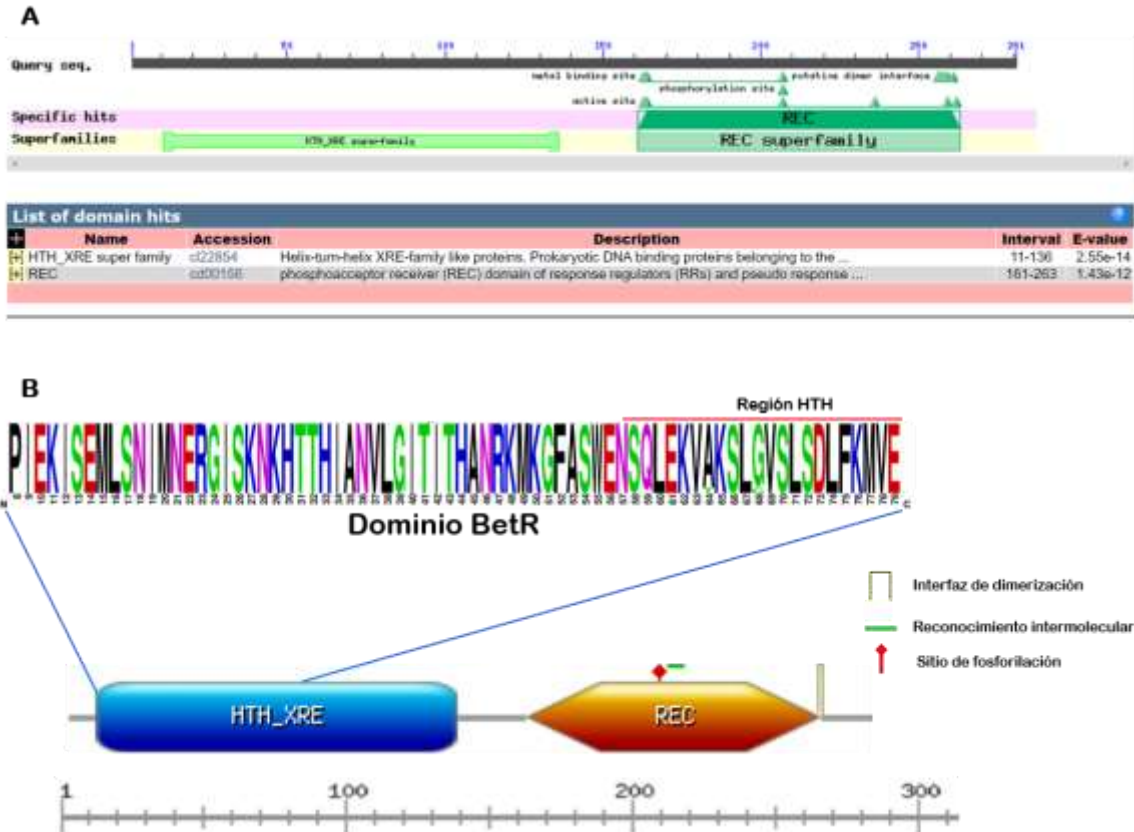


Figura 2. Dominios conservados de la proteína BetR de la cepa mutante KvDSM6 sensible a la desecación. A. Predicción de dominios HTH-XRE (*Helix-turn-helix XRE-family like proteins*) y REC (*Phosphoacceptor receiver domain*) en la base de datos dominios conservados CDD del Centro Nacional para la Información Biotecnológica NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>). B. Imagen representativa de los dominios HTH-XRE y REC de la proteína BetR. Se indica el dominio BetR y el motivo HTH que forman parte de la región HTH-XRE. También, se muestra la zona de la interfaz de dimerización (262-264), reconocimiento intramolecular (210 a 215) y el sitio fosfoaceptor Asp 207 ubicados en el dominio REC.

En las bacterias los sistemas de dos componentes (TCSs, del inglés *Two-component systems*) incluyen un sensor y un regulador de respuesta para adaptarse a los entornos cambiantes (Stock *et al.*, 2000). Los procesos regulados por TCSs en bacterias incluyen esporulación, patogenicidad, virulencia, quimiotaxis y transporte de membrana. Los reguladores de respuesta (RR) comparten el dominio común de fosfoaceptor REC y diferentes dominios efectores/de salida, como unión

a ADN, ARN, ligando, proteínas o dominios enzimáticos. Los reguladores de respuesta regulan la transcripción, la post-transcripción o la post-traducción, o tienen funciones tales como metiltransferasas, adenilato o diguanilato ciclasa, fosfodiesterasas específicas de c-di-GMP, histidina quinasa, serina/treonina proteína quinasa y proteínas fosfatasa, dependiendo de sus dominios de salida (Galperin, 2010). Los dominios REC funcionan como conmutadores mediados por fosforilación dentro de los RR, pero algunos también transfieren grupos fosfato en fosforelevos de múltiples pasos (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?ascbn=8ymaxaln=10yseltype=2yuid=cd00156>).

En resumen, en la mutante KvDSM6 sensible a la desecación se encuentra afectada en un gen que codifica para la proteína BetR que es un regulador de respuesta con un dominio de unión al ADN, HTH-XRE, perteneciente a la familia de reguladores transcripcionales de elementos de respuesta xenobiótica y un dominio fosfoceptor REC característicos en los sistemas TCSs de las bacterias. Por tal razón, para referirse a la cepa mutante KvDSM6 en lo sucesivo se nombrará “cepa BetR”.

No coloque referencia ya que yo realice el análisis bioinformático del gen betR y de los dominios conservados incluyendo la imagen

4. Justificación

Se ha demostrado que la tolerancia a la desecación confiere ventajas extraordinarias en climas extremos ya que permite estabilizar a las entidades biológicas durante largos periodos de tiempo y reiniciar de manera excepcional la actividad metabólica aún en condiciones de estrés. Por tal razón, los organismos tolerantes o sensibles pueden ser potencialmente fuente de recursos genéticos prometedores para mejorar la tolerancia al estrés ambiental de diversas especies de interés para el humano (Potts *et al.*, 2005; Esbelin *et al.*, 2018). Sin embargo, aún no se conoce en su totalidad qué genes están involucrados y cómo interactúan entre ellos para otorgar tolerancia o sensibilidad a la desecación. Aunado a esto, los trabajos realizados fundamentalmente se han enfocado al análisis del transcriptoma de hojas, polen y semillas de plantas de resurrección adultas tolerantes a desecación (Bartels, 2005).

Al respecto, los genes que confieren tolerancia a un determinado estrés se pueden encontrar en bacterias, hongos o invertebrados que son capaces de sobrevivir naturalmente en condiciones variables y extremas como la desecación y congelación (Alpert y Oliver, 2002). Así mismo, los organismos sensibles pueden ser un modelo de estudio extraordinario para completar la información que integre el sistema tolerancia-sensibilidad.

Debido a lo dicho anteriormente, el análisis por transcriptómica comparativa de bacterias tolerantes y sus mutantes sensibles a desecación, ofrece una perspectiva muy amplia para comenzar a descifrar la regulación de la expresión genética requerida para controlar las respuestas a condiciones ambientales extremas (Leprince y Buitink, 2015). De esta manera, mediante un análisis de transcriptómica comparativa se obtendrá información sobre los patrones de expresión genética asociados a la tolerancia-sensibilidad a la desecación utilizando como modelo a cepas de *Klebsiella variicola* T29A. Finalmente, estos estudios facilitarán la comprensión general de un proceso con aplicaciones biotecnológicas esenciales

para desarrollar variedades de organismos que se adapten de forma óptima al entorno cambiante y que toleren al máximo el estrés por desecación.

5. Hipótesis

El estudio masivo desde la óptica de la transcriptómica revelará las diferencias en los patrones de expresión genética implicados en la tolerancia y sensibilidad a la desecación ambiental en las cepas de *K. variicola* T29A y su mutante BetR.

6. Objetivos

6.1. General

Analizar las variaciones en la expresión genética presentes en la tolerancia o sensibilidad a la desecación en las cepas de *K. variicola* T29A y su mutante BetR mediante transcriptómica.

6.2. Particulares

- Evaluar la tolerancia y/o sensibilidad a la desecación ambiental durante dieciocho días de las cepas *K. variicola* T29A y su mutante BetR.
- Analizar la expresión de genes, en las cepas *K. variicola* T29A y su mutante BetR, presentes en la condición de tolerancia y sensibilidad a la desecación mediante microarreglos de ADN.
- Comparar los perfiles de expresión genética entre la cepa silvestre *K. variicola* T29A tolerante a desecación y su mutante sensible BetR.

7. Materiales y Métodos

7.1 Cepas bacterianas y medios de cultivo

En el presente trabajo se utilizó la cepa silvestre T29A de *K. variicola* aislada de caña de azúcar (Rosenblueth *et al.*, 2004) y su cepa mutante BetR obtenida por inserción azarosa del miniTn5 (Corral-Lugo, 2010). La cepa silvestre T29A fue mantenida en placas Petri con medio LB sólido. Así mismo, para verificar rutinariamente la selección de bacterias Gram-negativas y la fermentación de lactosa como característica descriptiva de las cepas del género *Klebsiella* se realizaron cultivos en medio MacConkey en dónde se observa el crecimiento de colonias de color rosa para microorganismos fermentadores de carbohidratos (Holt *et al.*, 2000). De manera similar, la cepa mutante *K. variicola* BetR se cultivó y mantuvo en placas Petri de medio LB sólido y medio MacConkey, pero suplementados con Kanamicina (Km) a una concentración 80 µg/mL. Para su mantenimiento de manera continua todos los cultivos fueron incubados a 30°C durante 24 horas y resguardados a 4°C hasta su uso posterior. La formulación de los medios de cultivo utilizados se muestra en el anexo 1.

7.2 Ensayos de desecación ambiental

Para evaluar la tolerancia o sensibilidad a la desecación se realizó una cinética de desecación ambiental controlada durante 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18 días para la cepa silvestre tolerante *K. variicola* T29A y la cepa mutante BetR sensible a desecación (Fig. 3). De acuerdo con los protocolos descritos previamente (Molina-Romero *et al.*, 2017 y Pazos-Rojas *et al.*, 2018), en primera instancia se obtuvo un precultivo de 10 mL de medio líquido crecido durante 24 horas a 30°C con agitación de 180-200 rpm. Posteriormente, se midió la densidad óptica (DO) del cultivo en fase estacionaria a 620 nm en un espectro de luz visible y se ajustó la cantidad necesaria de precultivo para inocular 30 mL de medio líquido a una DO de 0.05. El cultivo fue incubado por 24 horas a 30°C con agitación de 180-200 rpm. Al término del tiempo, se registró la DO a 620 nm y se procedió a realizar 2 lavados con 30 mL de agua destilada estéril cada uno. Para dicho propósito, los cultivos se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante fue eliminado y el

botón celular fue resuspendido en 30 mL de agua destilada estéril. Después, la suspensión celular lavada con agua fue alicuotada por quintuplicado en un volumen de 500 μ L para cada cepa, ya sea silvestre o mutante, y para cada tercer día de desecación ambiental (35 alícuotas en total en microtubos de 1.5 mL). Se registró el peso de todos los microtubos para realizar un monitoreo de la pérdida de agua antes y después de la desecación. Finalmente, cinco alícuotas fueron sometidas al método de goteo en placa para cuantificar las unidades formadoras de colonias (UFC) antes de la desecación (AD), correspondiendo al día cero. El resto de los microtubos (30 alícuotas) fueron sellados con tapones de algodón con gasa estériles y sometidos al ensayo de desecación ambiental mediante la incubación en una cámara de desecación a 30°C y 30-40% de humedad relativa (HR).

Cada tercer día posterior a la desecación (DPD) se tomaron cinco microtubos al azar, a los cuales se registró su peso sin tapón de algodón y se les adicionó agua destilada estéril para completar 500 μ L de volumen final. Las células desecadas fueron recuperadas mediante la rehidratación durante 20 minutos a temperatura ambiente. Más tarde, las células desecadas fueron resuspendidas suavemente por pipeteo subiendo y bajando el volumen de 5 a 6 veces e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. En seguida, se realizó una agitación vigorosa en un vortex durante 30 segundos para hacer siete diluciones seriadas requeridas para monitorear el crecimiento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) usando el método de goteo en placa (Naghili *et al.*, 2013). Todas las placas se incubaron en un cuarto de cultivo a 30°C durante 24 horas para visualizar UFC de aproximadamente 1 a 1.5 mm.

Los datos del conteo de UFC antes y después de la desecación ambiental se utilizaron para calcular la tasa de supervivencia bacteriana (BSR, del inglés "*Bacteria Survival Ratio*") mediante la relación entre el logaritmo del número de células presentes en la suspensión en cualquier tiempo posterior de la desecación (PD), más 1 entre el logaritmo del número de células viables antes de la desecación

(AD), multiplicado por 100 (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006). Todo esto expresado en la siguiente formula:

$$\text{BSR} = [(\text{Log UFC/ml PD}+1) / \text{Log UFC AD}] \times 100$$

Para determinar la mejor condición se realizaron dos cinéticas de desecación ambiental partiendo de precultivos, cultivos y recuperación de células desecadas ya sea en medio mínimo MM9-Glucosa o medio rico LB, cuya formulación se muestra en el anexo 1. Así mismo, se efectuó un ensayo para determinar el tiempo de rehidratación óptimo (20 minutos o 24 horas) de células desecadas. Para este ensayo, el precultivo y cultivo se realizó en medio LB y la recuperación de células desecadas/rehidratadas se efectuó en medio selectivo MacConkey (ver composición en anexo 1). En todos los experimentos de desecación ambiental la cepa BetR fue precultivada, cultivada y recuperada en medios de cultivo líquidos o sólidos suplementados con Km a una concentración final de 80 µg/mL.

7.3 Purificación del ARN total

Para obtener el ARN total se realizó un ensayo de desecación ambiental como se describe en la sección 7.2. Los precultivos y cultivos de ambas cepas T29A, tolerante y BetR sensible a la desecación, fueron crecidas en medio LB y LB suplementado con kanamicina 80 µg/mL, respectivamente. Los cultivos de ambas cepas fueron lavados dos veces y resuspendidos finalmente con 30 mL de agua estéril. En seguida, se procedió a hacer 20 alícuotas de 500 µL en microtubos de 1.5 mL para cada cepa. Para la condición control AD (día cero) se utilizaron 10 alícuotas de cada cepa para purificar el ARN total después del procedimiento del lavado y resuspensión con agua estéril. Las diez alícuotas restantes para cada cepa fueron sometidas a desecación controlada a 30°C y 30-40% de HR durante doce días.

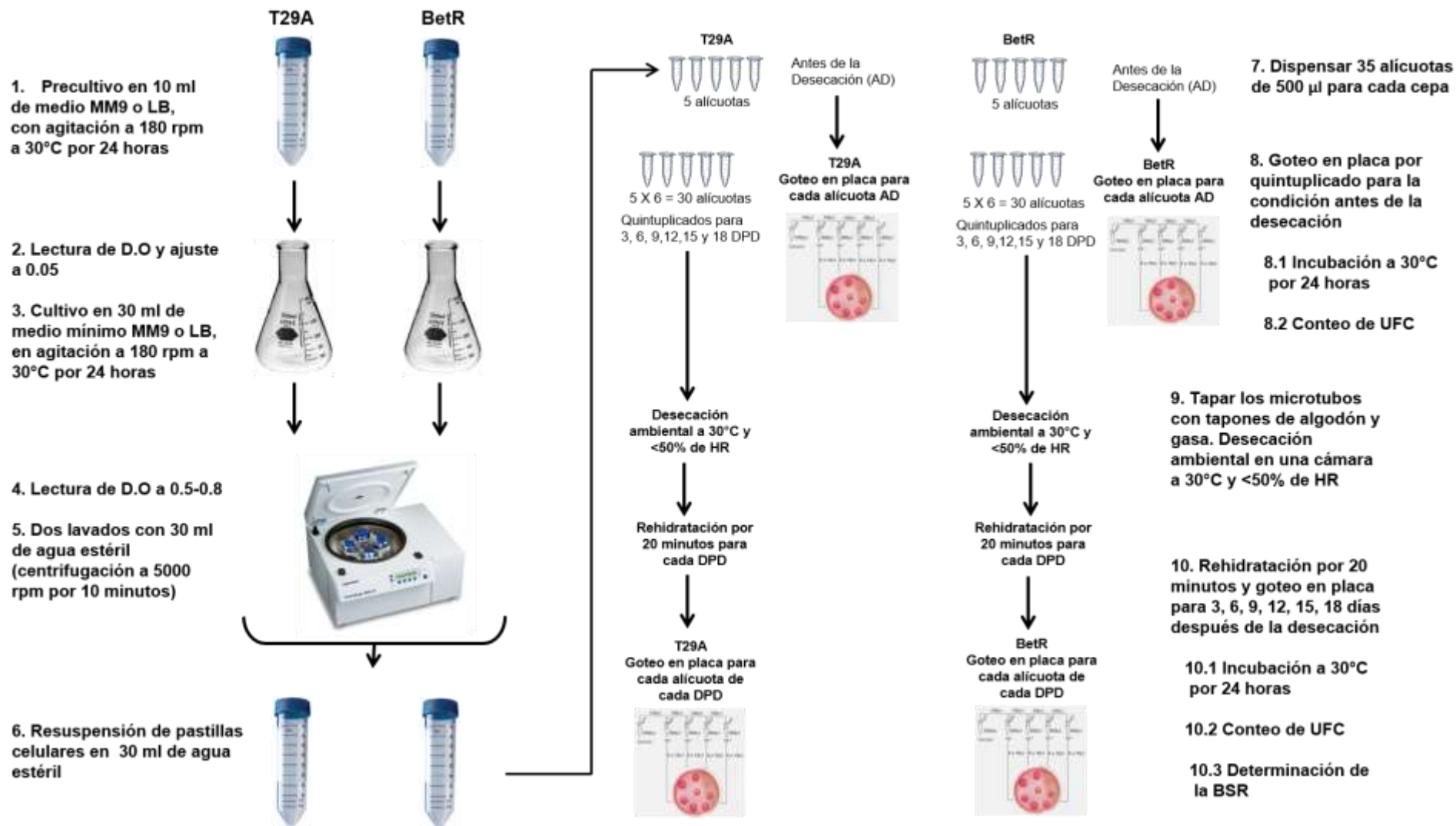


Figura 3. Representación esquemática de la metodología empleada para los ensayos de desecación ambiental. El diseño experimental se realizó con base a los trabajos de Muñoz-Rojas *et al.*, 2006, Molina-Romero *et al.*, 2017 y Pazos-Rojas *et al.*, 2018. Antes de la desecación (AD), día posterior a la desecación (DPD), unidades formadoras de colonias (UFC) y tasa de supervivencia bacteriana (BSR, del inglés “Bacteria Survival Ratio”).

Las células desecadas fueron monitoreadas cada tercer día de manera visual para supervisar y verificar la pérdida del agua durante el tiempo de desecación ambiental. Al término de este tiempo, se realizó una rehidratación con 500 μ L de agua estéril durante 20 minutos de acuerdo con el protocolo descrito en la sección 7.2 y consecutivamente el ARN total fue purificado. Para corroborar la supervivencia bacteriana de ambas cepas, se llevó a cabo un conteo de UFC antes y después de la desecación mediante el método de goteo en placa (Fig. 4A).

La purificación del ARN total se realizó utilizando el kit SV total RNA Isolation System de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega Madison, WI, USA). De manera general, para cada cepa y cada condición (antes y después de la desecación) se transfirió 1 mL de cultivo bacteriano lavado o rehidratado con agua estéril a un microtubo de 1.5 mL y se eliminó el sobrenadante mediante centrifugación a 13,400 rpm por 2 minutos. El sobrenadante se removió para dejar la pastilla celular lo más seca posible. Las células fueron resuspendidas en 100 μ L de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM a pH 8.0) conteniendo lisozima a una concentración de 0.4 mg/mL. Las muestras fueron agitadas suavemente e incubadas a temperatura ambiente durante 5 minutos. Más tarde, se añadieron 75 μ L de amortiguador de lisis, 350 μ L de amortiguador de dilución de ARN y 200 μ L de etanol al 95%. Las muestras se mezclaron por pipeteo de 3 a 5 veces. La mezcla se transfirió al sistema de columnas proporcionado por el kit de purificación y subsecuentemente se realizó una centrifugación a 13,400 rpm durante 1 minuto. El líquido no retenido fue desechado y la columna fue sometida a una limpieza con 600 μ L de solución de lavado de ARN. Las columnas se centrifugaron a 13,400 rpm por 1 minuto y el líquido fue eliminado. A continuación, se adicionó a cada columna 50 μ L de una solución de DNasa preparada al momento mediante la combinación de 40 μ L de amortiguador (Núcleo Amarillo), 5 μ L de $MnCl_2$ 0.09 M y 5 μ L de la enzima DNasa I (2 unidades). La reacción de degradación de ADN se efectuó a 20-25°C durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo, la reacción fue detenida mediante la adición de 200 μ L de amortiguador de paro de DNasa. Las columnas se

centrifugaron a 13,400 rpm durante 1 minuto. Luego, las columnas se limpiaron primero con 600 μ l y posteriormente con 250 μ l de amortiguador de lavado de ARN. En cada lavado se realizó una centrifugación de 1 o 2 minutos, respectivamente. El líquido fue eliminado y la columna fue transferida a un microtubo de 1.5 mL para la elución del ARN con 50 μ L de agua libre de nucleasa. El sistema acoplado (columna y microtubo) se sometió a una centrifugación a 13,400 rpm durante 1 minuto. El ARN purificado de ambas cepas antes y después de la desecación se cuantificó mediante la lectura de la densidad óptica (DO) a 260 y 280 nm en un nanodrop UV ND-1000 (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). La integridad del ARN fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X a 80 mV durante 45 minutos. El gel fue visualizado en un transiluminador UV (Fig. 4B). El ARN total permaneció resguardado hasta su análisis a -70°C . Todas las puntas para micropipeta y microtubos utilizados fueron esterilizados a 120 lb de presión por 20 minutos, con posterior secado a 95°C por 24 horas. Para las soluciones que requirieron la adición de etanol absoluto se utilizó el reactivo grado biología molecular (Sigma-Aldrich St. Louis MO, USA).

7.4 Microarreglos de ADN de dos canales

Debido a que la disponibilidad de microarreglos fundamentalmente es para especies modelo y no se cuenta con esta herramienta para *K. variicola*, el análisis de los cambios en la expresión genética de las cepas T29A y BetR sometidas a desecación se realizó mediante la hibridación heteróloga con microarreglos de ADN de *Escherichia coli* cepa K12. Al respecto, la viabilidad de este estudio se fundamenta en la cercanía filogenética, ya que *E. coli* K-12 y las especies del género *Klebsiella* pertenecen a la misma familia *Enterobacteriaceae* de la clase gammaproteobacterias (Holt *et al.*, 2000). Además, mediante diferentes enfoques genómicos se ha encontrado que existen 2423 genes (55%) homólogos y 82% de ADN homólogo en marcos de lectura abierta (ORF, del inglés open reading frame) ortólogos entre *E. coli* K-12 y *Klebsiella pneumoniae* (McClelland *et al.*, 2000), cuyo genoma es 95% homólogo a los genomas del resto de las especies del género *Klebsiella* (Barrios-Camacho *et al.*, 2019).

Los experimentos de microarreglos heterólogos se realizaron mediante el servicio ofrecido por la Unidad de Microarreglos del Laboratorio Nacional de Apoyo Tecnológico a las Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de México (UNAM). El microarreglo de ADN de dos canales está diseñado con base en el genoma completo de *E. coli* cepa K12 que tiene 4,608 genes más los controles internos, cada gen tiene 2 aplicaciones teniendo un número total de 9,600 aplicaciones. Las sondas de ADN específicas para cada uno de los genes tienen una longitud de 50 nucleótidos.

El ARN de ambas cepas antes y después de la desecación durante doce días fue precipitado mediante una reacción que contenía 50 μ L de las muestras de ARN, 5 μ L de acetato de sodio 3M pH 5.2 (concentración final 75 mM) y 138 μ L de etanol al 100% frío. Las muestras se agitaron por inversión hasta su homogenización y fueron almacenadas a -70°C durante 12 horas. Transcurrido el tiempo, las muestras se centrifugaron a 13,400 rpm durante 15 minutos y a continuación se transportaron a temperatura ambiente a la Unidad de Microarreglos de la UNAM en donde se efectuó la recuperación del ARN total precipitado, la síntesis del ADN complementario (ADNc), el marcaje indirecto del ADNc con moléculas fluorescentes Alexa-555 (muestras controles AD) y Alexa 647 (muestras 12 DPD), la hibridación del ADNc marcado al microarreglo y el análisis de las micromatrices. Se realizaron dos microarreglos, uno para hibridar el ADNc marcado de la cepa T29A antes y después de la desecación. El otro microarreglo fue para la misma condición solo que se utilizó el ADNc de la cepa BetR (cero y doce días de desecación). El análisis de las imágenes para cuantificar y determinar los genes regulados positivamente (*Up*, del inglés Upregulated) y regulados negativamente (*Down*, del inglés Downregulated) fue elaborada usando el programa Genarise. Se obtuvieron listas de genes *Up* y *Down* regulados para dos cortes de Z-Score correspondiente a 1.5 y 2.0. Las listas de genes *Up* y *Down* regulados se expresaron en función de T29A desecada por 12 días con respecto a T29A AD y BetR desecada por 12 días con respecto a BetR AD.

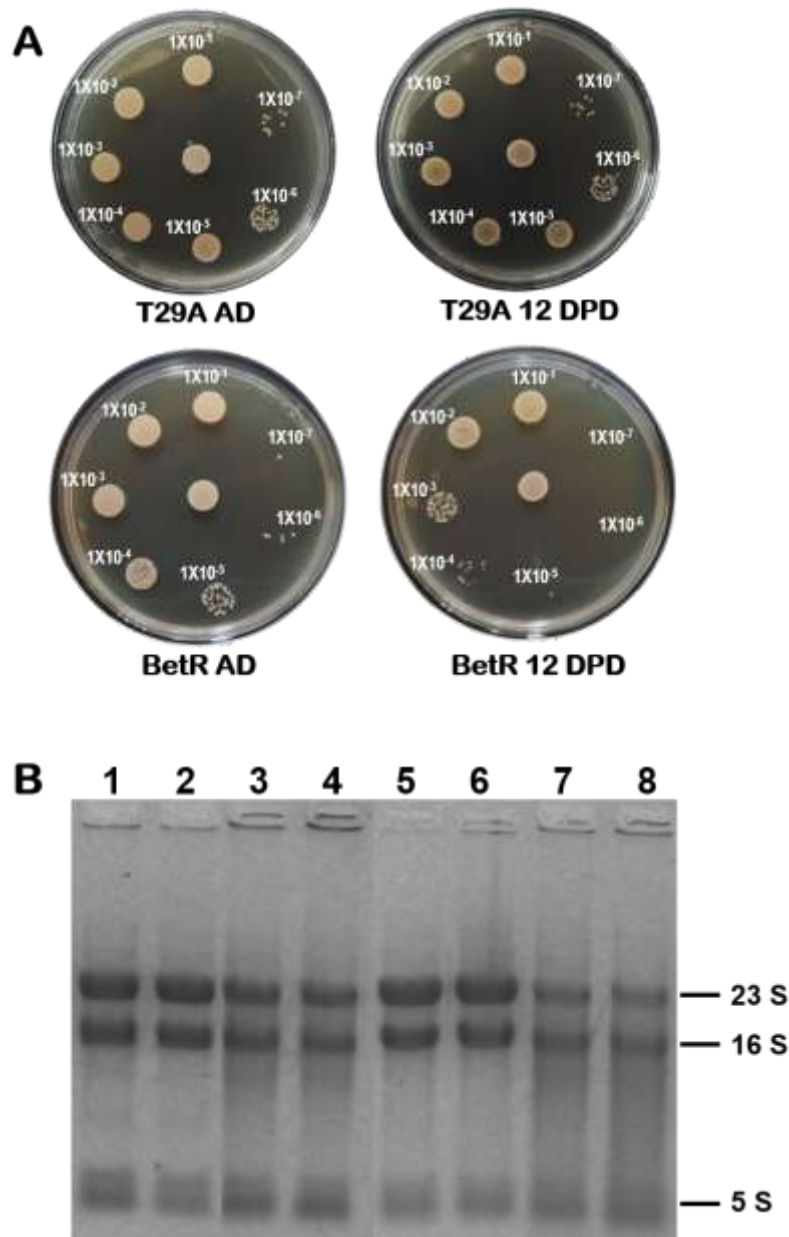


Figura 4. Controles de calidad durante el proceso de extracción de ARN total. (A) Goteo en placa de las cepas T29A y BetR antes de la desecación (AD) y 12 días posteriores a la desecación (DPD) utilizadas para la purificación del ARN total. (B) Fotografía del gel de agarosa al 1% para verificar la integridad del ARN total. Se indica la posición de las bandas correspondientes a los ARN ribosomales 23S, 16S y 5S para indicar que el ARN está intacto. Carriles del 1 y 2 ARN total extraído de la cepa T29A AD, carriles 3 y 4 ARN total de la cepa T29A purificado a los 12 DPD, carriles 5 y 6 ARN total obtenido de la cepa BetR AD y carriles 7 y 8 ARN total extraído a los 12 DPD.

Por favor, podría quedarse esta imagen en metodología, debido a que fueron controles de calidad para a ver los microarreglos

La clasificación de los genes por función y anotación de los genes *Up* y *Down* regulados para la cepa T29A y BetR se ejecutó usando la plataforma DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) considerando solamente las listas con un corte Z-Score de 2.0. La clasificación por función proporciona un medio rápido para reducir grandes listas de genes en grupos de genes relacionados funcionalmente para ayudar a desentrañar el contenido biológico capturado por tecnologías de alto rendimiento. La clasificación por anotación se realiza para identificar asociaciones de genes con múltiples anotaciones funcionales como términos de GO, interacciones proteína-proteína, dominios funcionales de proteínas, asociaciones de enfermedades, bio-rutas, características generales de secuencia, homologías, resúmenes funcionales de genes, expresiones de tejidos génicos, literatura, etc. En el caso de los genes que no fueron agrupados se debió a que codifican para proteínas hipotéticas, predichas o conservadas que aún no se determina su función.

8. Resultados

8.1 Cinéticas de tolerancia y/o sensibilidad a la desecación de las cepas de *K. variicola* T29A y su mutante BetR.

Para evaluar la tolerancia y/o sensibilidad a la desecación de las cepas de *K. variicola* T29A y BetR, se efectuó una cinética antes y después de la desecación durante 18 días. Los precultivos y cultivos se realizaron en medio mínimo MM9-Glucosa, la rehidratación fue de 20 minutos (corta) y la recuperación de las células control AD y desecadas/rehidratadas DPD, se efectuaron en medio sólido MM9-Glucosa y LB. Se monitoreó la tasa de supervivencia bacteriana (BSR) antes y después de la desecación usando el conteo de UFC según el método de goteo en placa. En el transcurso de este ensayo se vigiló la pérdida de agua de las muestras antes y durante la desecación a 30°C y 30-40% de HR. Como ejemplo, en la Fig. 5 se observa que bajo estas condiciones la pérdida de agua comenzó en el día tres y a partir del día seis hasta el día dieciocho las células se encontraban completamente sin agua, tanto en las muestras de la cepa T29A (Fig. 5A) como para la cepa BetR (Fig. 5B), confirmándose que las células se desecaron desde el día seis y se mantuvieron desecadas hasta el día dieciocho. Cabe resaltar que en todos los experimentos de desecación se realizó el control de peso y en todos fue reproducible la pérdida completa de agua a los 6 DPD manteniéndose hasta los 18 DPD.

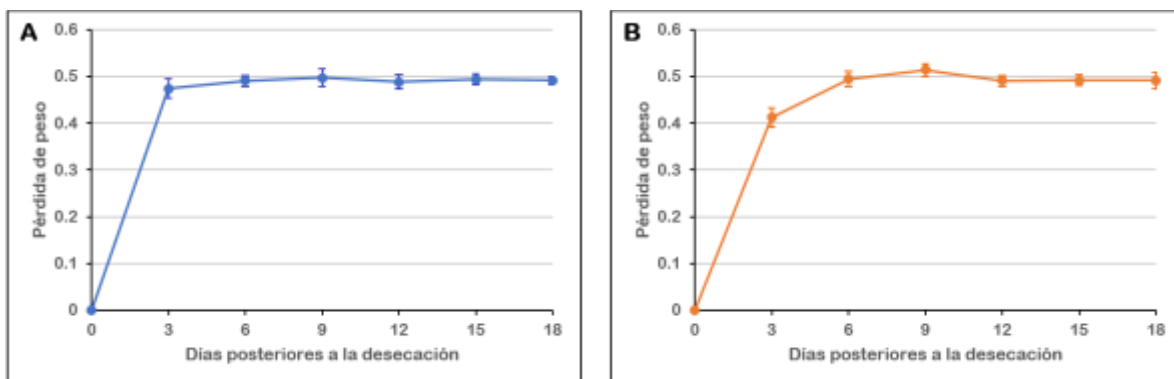
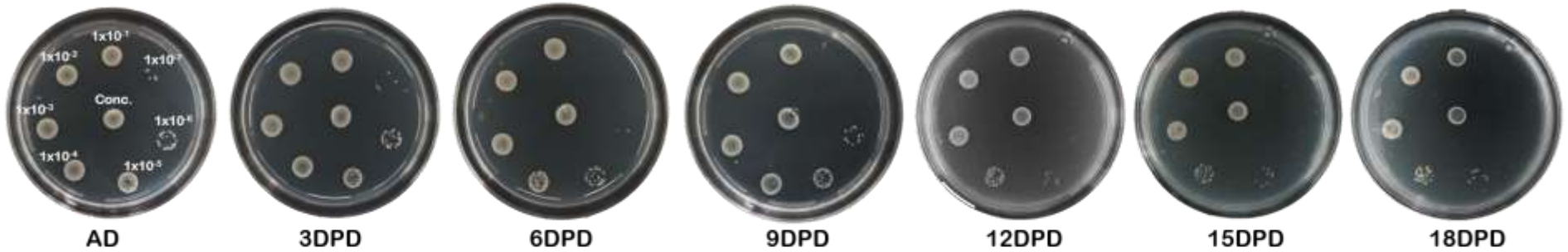


Figura 5. Control de pérdida de agua de las muestras antes y después de la desecación ambiental. (A) Cepa T29A, (B) Cepa BetR (B).

En la figura 6 y 7 se visualizan una serie de placas de Petri representativas de las cinco replicas realizadas ya sea en medio MM9-Glucosa o LB, respectivamente para cada cepa. En el caso de la cepa silvestre T29A se puede observar el crecimiento de UFC en el medio MM9-Glucosa sólido en todas las diluciones AD (1×10^{-1} hasta 1×10^{-7}). Posteriormente, el número de UFC se mantuvo a los 3 DPD cuando aún las células poseen una cantidad mínima de agua. A los 6 y 9 DPD cuando las células están desecadas se observó una disminución en un orden de magnitud, ya que las UFC se contabilizaron a partir de la dilución 1×10^{-6} . En los siguientes DPD 12, 15 y 18, el descenso fue de igual manera en un orden de magnitud detectándose UFC en la dilución 1×10^{-5} (Fig. 6A). En el caso de la cepa mutante BetR recuperada en medio MM9-Glucosa AD se apreciaron UFC en todas las diluciones (1×10^{-1} hasta 1×10^{-7}). Posteriormente, a los 3 DPD el número de UFC se redujo un orden de magnitud detectándose las colonias bacterianas hasta la dilución 1×10^{-6} . Sin embargo, 6 DPD la reducción fue considerablemente drástica, debido a que se detectaron UFC en la dilución 1×10^{-2} . Posteriormente, los 9 DPD se identificaron UFC en la dilución 1×10^{-1} . Para los siguientes monitoreos correspondientes a los 12, 15 y 18 DPD no se observó crecimiento alguno de UFC (Fig. 6B). Para la recuperación de células en medio LB sólido AD y desecadas/rehidratadas, el comportamiento fue equivalente al registrado en placas de medio MM9-Glucosa, detectando tolerancia o sensibilidad a la desecación en las cepas T29A y BetR, respectivamente (Fig. 7A y 7B). Sin embargo, en el medio LB el crecimiento de bacterias sometidas a estrés por desecación fue un poco más restrictivo, ya que en las placas de la cepa T29A las UFC cuantificadas en la dilución 1×10^{-6} y 1×10^{-5} a partir de los 6 a los 18 DPD fue menor que en la recuperación con medio MM9-Glucosa (Fig. 7A). Por su parte, la cepa mutante BetR también presentó una disminución en el número de UFC a los 6 DPD registrándose UFC en la dilución 1×10^{-1} a diferencia del conteo en la dilución 1×10^{-2} en el medio MM9-Glucosa. Para los 9 DPD el registro de UFC en el medio LB se realizó en la solución concentrada, mientras que para la recuperación en medio MM9 se hizo en la dilución 1×10^{-1} . De la misma manera, en ambos medios de recuperación a partir de los 12, 15 y 18 DPD no hubo crecimiento de UFC en ninguna dilución o solución concentrada (Fig. 7B).

El conteo de UFC se utilizó para determinar la tasa de supervivencia bacteriana (BSR) de la cepa resistente T29A y su mutante sensible BetR a la desecación en la condición de precultivo y cultivo en medio MM9-Glucosa (Cuadro 1). La BSR de la cepa silvestre T29A se mantuvo en un promedio de 99 a 80 en ambos medios de cultivo indicando alta tolerancia a la desecación. Sin embargo, la BSR de la cepa mutante BetR decayó drásticamente a los 6 DPD a niveles de 54.47 ± 1.52 y 44.8 ± 5.61 en ambos medios de recuperación (MM9-Glucosa y LB). Posteriormente, la BSR continuó disminuyendo a los 9 DPD (41.49 ± 6.03 y 28.4 ± 3.07) hasta llegar a 0.0 hasta los 18 DPD. Representando la BSR de manera gráfica (Fig. 8), se demuestra que la cepa T29A es tolerante durante los 18 días a la desecación ambiental monitoreada en placas de medio MM9-Glucosa y LB. Además, la cepa BetR mostró sensibilidad a la desecación ya que su BSR se abatió completamente desde la pérdida del agua a partir del día 6 hasta el día 18 de desecación ambiental. En ambas cepas se observó una mejor respuesta de supervivencia cuando las células desecadas/rehidratadas fueron recuperadas en mismo medio (MM9-Glucosa) en cual fueron precultivadas y cultivadas AD.

A *Klebsiella variicola* T29A



B *Klebsiella variicola* BetR

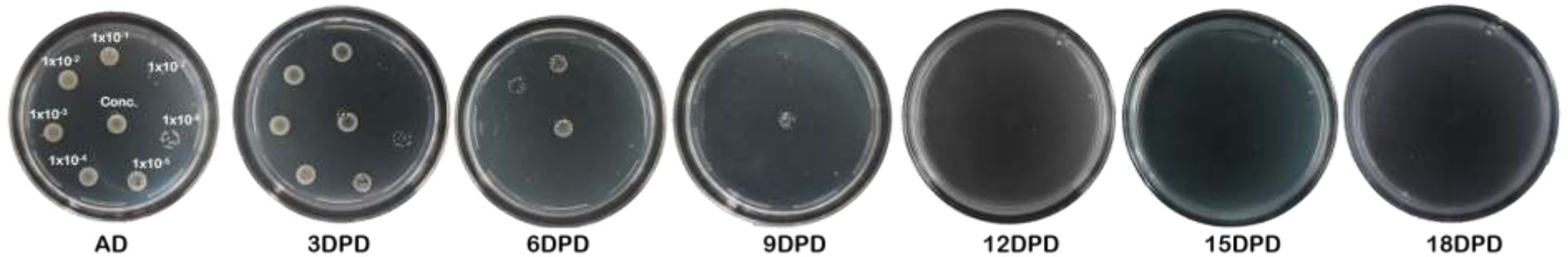


Figura 6. Recuperación en medio MM9-Glucosa de las cepas de *Klebsiella variicola* precultivadas/cultivadas en medio MM9-Glucosa. Las cepas T29A y BetR fueron precultivadas/cultivadas en medio MM9-Glucosa y sometidas a ensayo de desecación ambiental hasta por 18 días. Los monitoreos de recuperación y viabilidad celular se realizaron antes de la desecación (AD) y cada tercer día posterior a la desecación (DPD). Para la recuperación después de la desecación se realizó con una rehidratación de 20 minutos y cultivo en placas de medio MM9-Glucosa. (A) Goteo en placa de la cepa silvestre *K. variicola* T29A AD y hasta 18 DPD. (B) Goteo en placa de la cepa mutante *K. variicola* BetR AD y hasta 18 DPD.

A *Klebsiella variicola* T29A



B *Klebsiella variicola* BetR

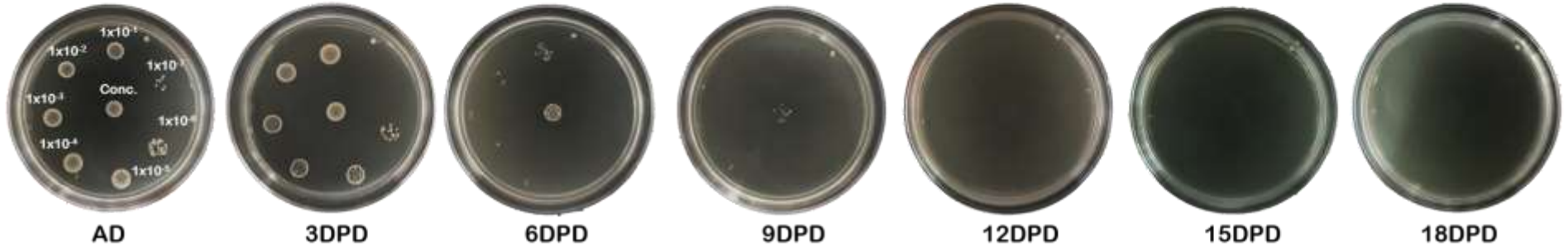


Figura 7. Rescate en medio LB de las cepas de *Klebsiella variicola* precultivadas/cultivadas en medio MM9-Glucosa. Las cepas T29A y BetR fueron precultivadas/cultivadas en medio MM9-Glucosa y posteriormente expuestas al estrés por desecación ambiental durante 18 días. Se realizó un monitoreo de la viabilidad celular antes de la desecación AD y cada tercer día posterior a la desecación (DPD) durante 18 días. (A) Goteo en placa con medio LB de la cepa silvestre *K. variicola* T29A AD y hasta 18 DPD. (B) Goteo en placa con medio LB de la cepa mutante *K. variicola* BetR AD y hasta 18 DPD.

Cuadro 1. Tasa de supervivencia bacteriana (BSR) de las cepas de *Klebsiella variicola* T29A y BetR desecadas durante 18 días. Las cepas T29A y BetR se precultivaron/cultivaron en medio MM9-Glucosa y posteriormente fueron sometidas a desecación ambiental hasta por 18 días. El monitoreo de la viabilidad celular se realizó antes de la desecación (AD) y días posteriores a la desecación (DPD). Las cepas fueron rehidratadas por 20 minutos y el conteo de UFC fue efectuado mediante la técnica de goteo en placas con medio MM9-Glucosa o LB para cada cepa. Después de 24 horas de incubación al 31°C se contabilizaron las UFC y los datos obtenidos fueron utilizados para calcular la tasa de supervivencia bacteriana mediante la ecuación $BSR = [(Log UFC/ml PD+1) / Log UFC AD] \times 100$. Se muestra para cada dato de BSR la desviación estándar.

	BSR T29A		BSR BetR	
	Medio MM9-Glucosa	Medio LB	Medio MM9-Glucosa	Medio LB
0 AD	100	100	100	100
3 DPD	99.84±0.76	98.94±0.75	95.39±1.46	97.2±0.57
6 DPD	84.39±4.48	84.99±2.07	54.47±1.52	44.8±5.61
9 DPD	84.78±0.49	86.01±5.43	41.49±6.03	28.4±3.07
12 DPD	83.69±0.89	82.42±1.06	0.0±0.0	0.0±0.0
15 DPD	81.82±2.72	79.60±1.67	0.0±0.0	0.0±0.0
18 DPD	80.21±2.59	79.06±1.60	0.0±0.0	0.0±0.0

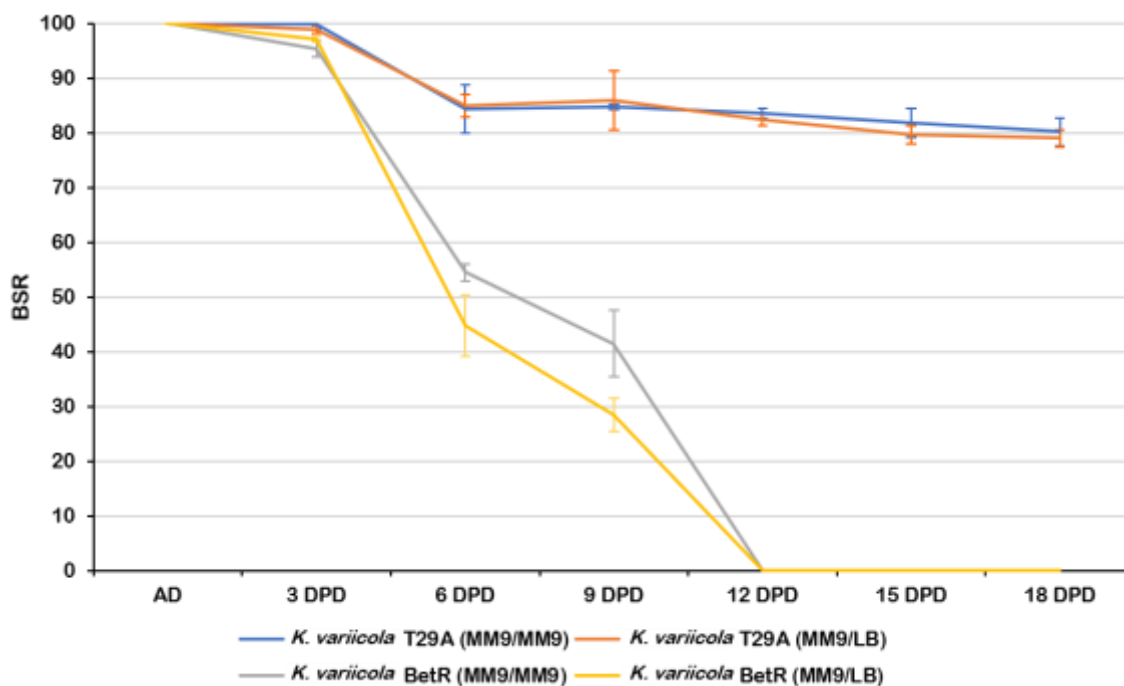


Figura 8. Representación gráfica de la tasa de supervivencia bacteriana (BSR) antes de la desecación (AD) y días posteriores a la desecación (DPD) a lo largo de 18 días.

A continuación, se realizó otra cinética de desecación ambiental partiendo de precultivos y cultivos crecidos en medio LB, lavado de células con agua estéril, desecación durante 18 días, rehidratación corta de 20 minutos y recuperación de bacterias desecadas en medio MM9-Glucosa y LB (Fig. 9 y 10). Con respecto a la cepa silvestre T29A monitoreada AD en medio MM9-Glucosa y LB se contabilizaron UFC en todas las diluciones. Subsecuentemente, a los 3 DPD cuando aún existe un nivel mínimo de agua el conteo de UFC se registró en todas las diluciones. Durante los 6, 9, 12, 15 y 18 DPD el registro de UFC se mantuvo constante en la dilución 1×10^{-6} , aunque conforme aumentaban los días de desecación el número de UFC disminuyó progresivamente de 14 hasta 2 (Fig. 9A y 10A). Para la cepa mutante BetR la detección de UFC AD se realizó en todas las diluciones en ambos medios MM9-Glucosa y LB. No obstante, para los DPD se observó variación en el conteo de UFC dependiendo del medio de recuperación. Cuando las células desecadas/rehidratadas se recuperaron en medio MM9-Glucosa la presencia de UFC fue disminuyendo en aproximadamente un orden de magnitud de manera progresiva sin llegar a cero a los 18 DPD (Fig. 9B). En la recuperación en medio LB se observó que el número de UFC comenzó a reducirse a los 6 DPD ya que el conteo se realizó en la dilución 1×10^{-5} . A los 9 DPD las UFC se detectaron en la dilución 1×10^{-3} y para los 18 DPD los niveles de UFC decayeron a cero (Fig. 10B). Es importante mencionar que el conteo de UFC para ambas cepas antes y después de la desecación monitoreadas en medio MM9-Glucosa sólido se alcanzó hasta las 48 horas de incubación, observándose colonias de aproximadamente 1 mm de longitud. Para el monitoreo en medio LB sólido las UFC se contaron a las 24 horas de incubación visualizándose colonias de 1.5 mm. Estos datos indican una mejor capacidad de recuperación antes y después de la desecación cuando las células son cultivadas y rescatadas en el mismo medio, que en este caso fue del medio LB.

Para esta condición de precultivos y cultivos en medio LB, la BSR de la cepa T29A se mantuvo >84 hasta los 18 DPD en ambas situaciones de recuperaciones de 48 horas en medio MM9-Glucosa o 24 horas en medio LB. Con respecto a la cepa BetR, la BSR para las células desecadas/rehidratadas y recuperadas en medio

MM9-Glucosa comenzó $>93 \pm 2$ y decayó hasta 30 ± 7.37 de manera paulatina. Contrario a la BSR para la recuperación en medio LB sólido, donde el decaimiento fue más severo y a los 18 DPD se llegó a niveles de 0.0 (Cuadro 2). Gráficamente, se observa la diferencia significativa entre una mejor recuperación de las células desecadas/rehidratadas utilizando medio MM9-Glucosa que usando medio LB (Fig. 11). Sin embargo, los conteos de UFC para el medio MM9-Glucosa se realizó a las 48 horas de incubación, mientras que para el medio LB se realizó a las 24 horas.

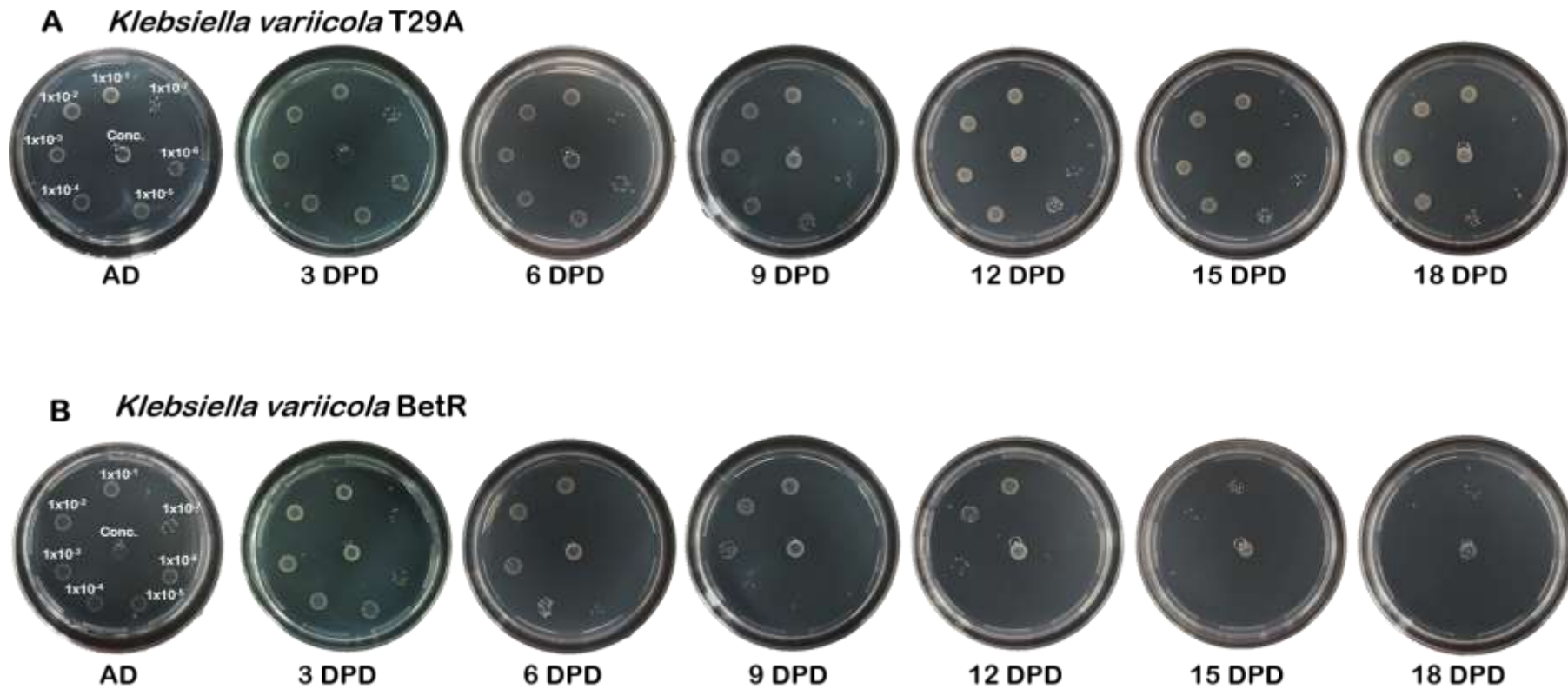
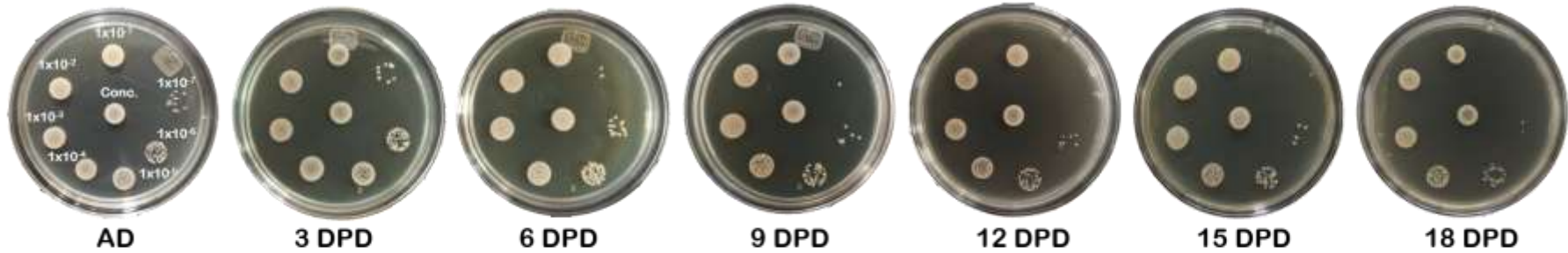


Figura 9. Goteo en placa en medio MM9-Glucosa de bacterias precultivadas/cultivadas en medio LB. Se realizaron precultivos y cultivos de las cepas T29A y BetR en medio LB. Posteriormente, las cepas fueron expuestas a la desecación ambiental durante 18 días con monitoreos de viabilidad celular antes de la desecación (AD) y cada tercer día después de la desecación (DPD). El conteo de UFC se realizó después de 48 horas de incubación a 31 °C. (A) Goteo en placa con medio MM9-Glucosa de la cepa *K. variicola* T29A AD y hasta por 18 DPD. (B) Goteo en placa de la cepa mutante *K. variicola* BetR AD y hasta 18 DPD.

A *Klebsiella variicola* T29A



B *Klebsiella variicola* BetR



Figura 10. Goteo en placa en medio LB de células bacterianas precultivadas/cultivadas en medio LB. Los precultivos/cultivos se efectuaron en medio LB y los ensayos de desecación ambiental se extendieron hasta los 18 días. Para contabilizar las UFC viables antes de la desecación (AD) y días posteriores a la desecación (DPD) se realizó un monitoreo mediante el goteo en placa en medio LB. (A) Placas para la cepa *K. variicola* T29A AD y hasta 18 DPD. (B). Placas para la cepa mutante *K. variicola* BetR AD y hasta 18 DPD.

Cuadro 2. Tasa de supervivencia bacteriana (BSR) de las cepas de *Klebsiella variicola* T29A y BetR expuestas a desecación ambiental. Primeramente, las cepas T29A y BetR se precultivaron/cultivaron en medio LB y posteriormente se expusieron al estrés por desecación durante 18 días. Antes de la desecación (AD) y cada tercer día posterior a la desecación (DPD) se efectuó un monitoreo de la viabilidad celular mediante el método de goteo en placa. Las unidades UFC fueron contabilizadas 48 o 24 horas después de la incubación a 31°C para las placas de medio MM9-Glucosa o LB, respectivamente. Los datos de las UFC se emplearon para calcular la tasa de supervivencia bacteriana (BSR) utilizando la fórmula $BSR = [(Log UFC/ml PD+1) / Log UFC AD] \times 100$. Para cada dato de BSR se indica la desviación estándar.

	BSR T29A		BSR BetR	
	Medio MM9-Glucosa	Medio LB	Medio MM9-Glucosa	Medio LB
0 AD	100	100	100	100
3 DPD	98.57±2.01	99.48±0.75	93.85±1.69	94.8±2.96
6 DPD	89.33±1.39	89.37±1.00	74.76±3.36	71.6±2.37
9 DPD	85.75±2.55	87.44±1.73	64.18±1.24	57.2±2.94
12 DPD	85.65±1.80	86.18±1.81	56.82±1.83	40.2±2.18
15 DPD	86.50±1.32	85.25±0.86	39.67±3.42	7.15±3.0
18 DPD	83.98±1.80	84.23±2.37	30.0±7.37	0.0±0.0

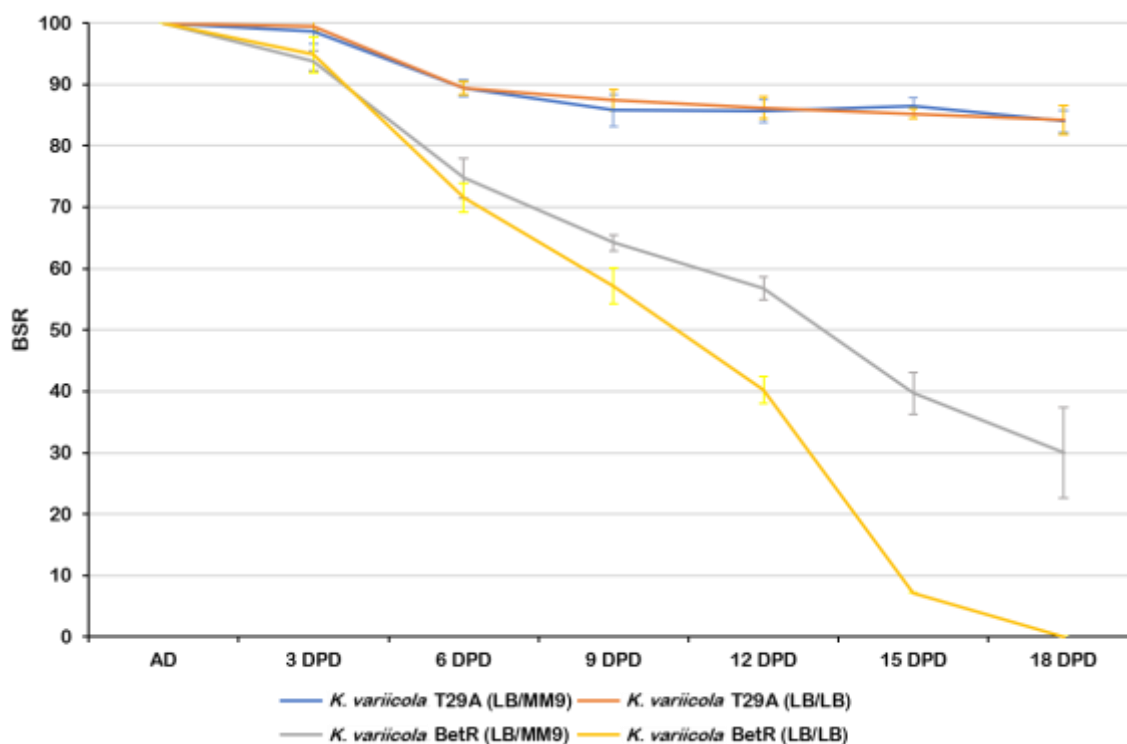


Figura 11. Gráfica de la tasa de supervivencia bacteriana (BSR) de células antes de la desecación (AD) y días posteriores a la desecación (DPD) durante 18 días.

8.2 Efecto del tiempo de rehidratación en la tolerancia y/o sensibilidad de las cepas de *K. variicola* T29A y BetR sometidas a desecación.

Debido a que se observó una mejor repuesta al estrés por desecación de la cepa silvestre T29A y su mutante BetR cuando son precultivadas y cultivadas en medio LB, se procedió a analizar bajo esta condición el efecto de la rehidratación corta o prolongada (20 minutos y 24 horas) sobre la tolerancia y/o sensibilidad de las cepas utilizadas en este trabajo (Fig. 12 y 13). Para este ensayo la recuperación de células desecadas/rehidratadas se efectuó en medio selectivo MacConkey. Como se observa en la figura 12 la cepa T29A mostró tolerancia a la desecación en ambas condiciones de rehidratación ya que se identificaron UFC en las diluciones 1×10^{-6} tanto con 20 minutos y 24 horas de estar en contacto con el agua. Además, se observó que en las placas con 20 minutos de rehidratación las colonias tuvieron 1.5 mm de longitud y un color rosa pálido, condición que cambió con la rehidratación por 24 horas ya que las UFC midieron 2 mm y su color fue rosa fuerte o rojo. Con respecto a la cepa BetR la contabilización de UFC empezó a disminuir a los 6 DPD (dilución 1×10^{-4}) hasta los 18 DPD (dilución 1×10^{-1}) de desecación con 20 minutos de rehidratación. No obstante, para la rehidratación larga de 24 horas se observó un aumento en un orden de magnitud en el número de UFC ya que a los 6 DPD se contaron UFC en la dilución 1×10^{-5} y a los 18 DPD en la dilución 1×10^{-3} . Además, con rehidratación corta las colonias midieron 0.5 mm y fueron incoloras. Mientras, que con la rehidratación larga las colonias midieron 1.0 mm y su color fue rosa fuerte (Fig. 13).

La BSR fue evaluada en los dos diferentes tiempos de rehidratación después del estrés por desecación ambiental (Cuadro 3). La cepa T29A resistente a la desecación mostró una BSR >80 de manera constante durante los dieciocho días de desecación ya sea con 20 minutos o 24 horas de rehidratación, aunque se observó una disminución de la tasa de supervivencia a partir del día seis con respecto a la BSR antes de la desecación. También, se encontró que la rehidratación por 24 horas mejora la BSR a partir los 6 DPD hasta los 18 DPD. La cepa mutante BetR sensible a la desecación disminuyó significativamente su BSR

desde los 6 hasta los 18 DPD (BSR $>74\pm 0.54$ hasta BSR $>37\pm 2$). Sin embargo, se observó un aumento significativo en la BSR con 24 horas de rehidratación, pero sin recuperar sus niveles de supervivencia como AD (BSR $>78\pm 1.6$ hasta BSR $>57\pm 1.7$).

***Klebsiella variicola* T29A 20 min y 24 horas de rehidratación**

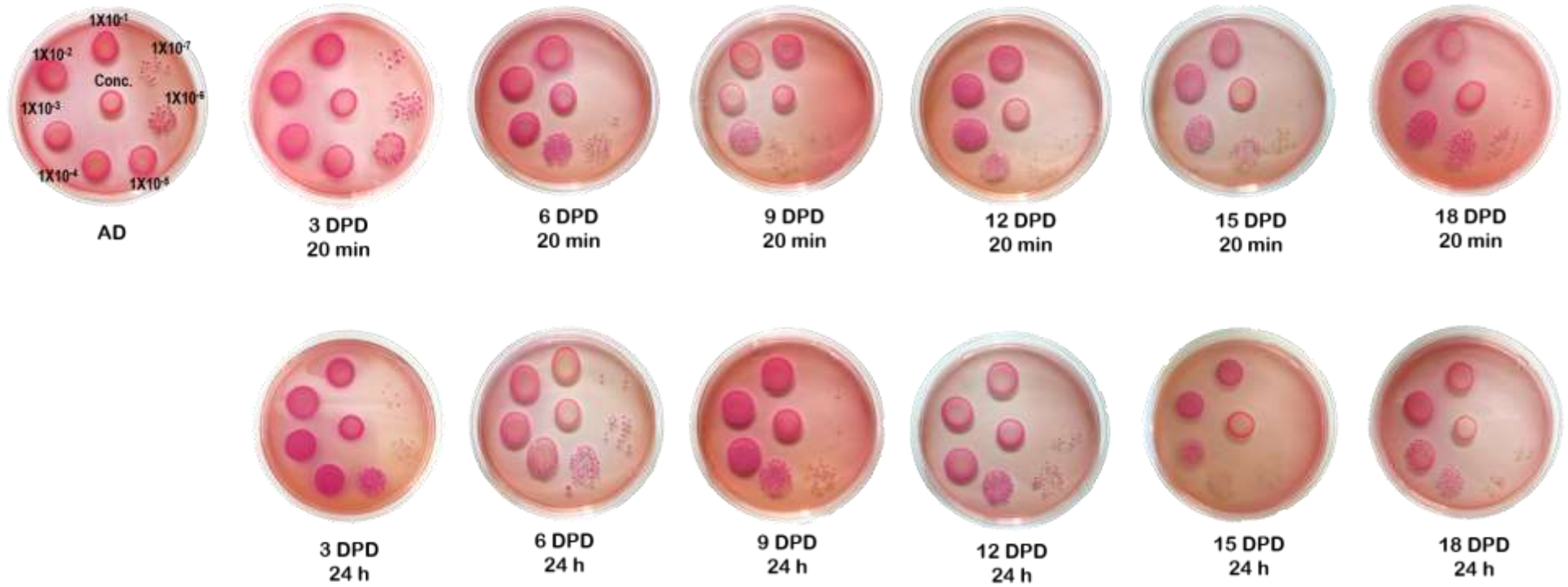


Figura 12. Recuperación en medio MacConkey de la cepa de *Klebsiella variicola* T29A desecada durante 18 días con rehidrataciones de 20 minutos y/o 24 horas. La cepa T29A fue precultivada/cultivada en medio LB y expuesta al estrés por desecación ambiental durante 18 días. Los monitoreos de viabilidad celular se ejecutaron antes de la desecación (AD) y cada tercer día hasta completar los 18 días posteriores a la desecación (DPD). Las células desecadas fueron rehidratadas por un periodo corto de 20 minutos o un periodo largo de 24 horas. La contabilización de UFC se efectuó utilizando el método de goteo en placa con medio MacConkey e incubación por 24 horas a 31°C.

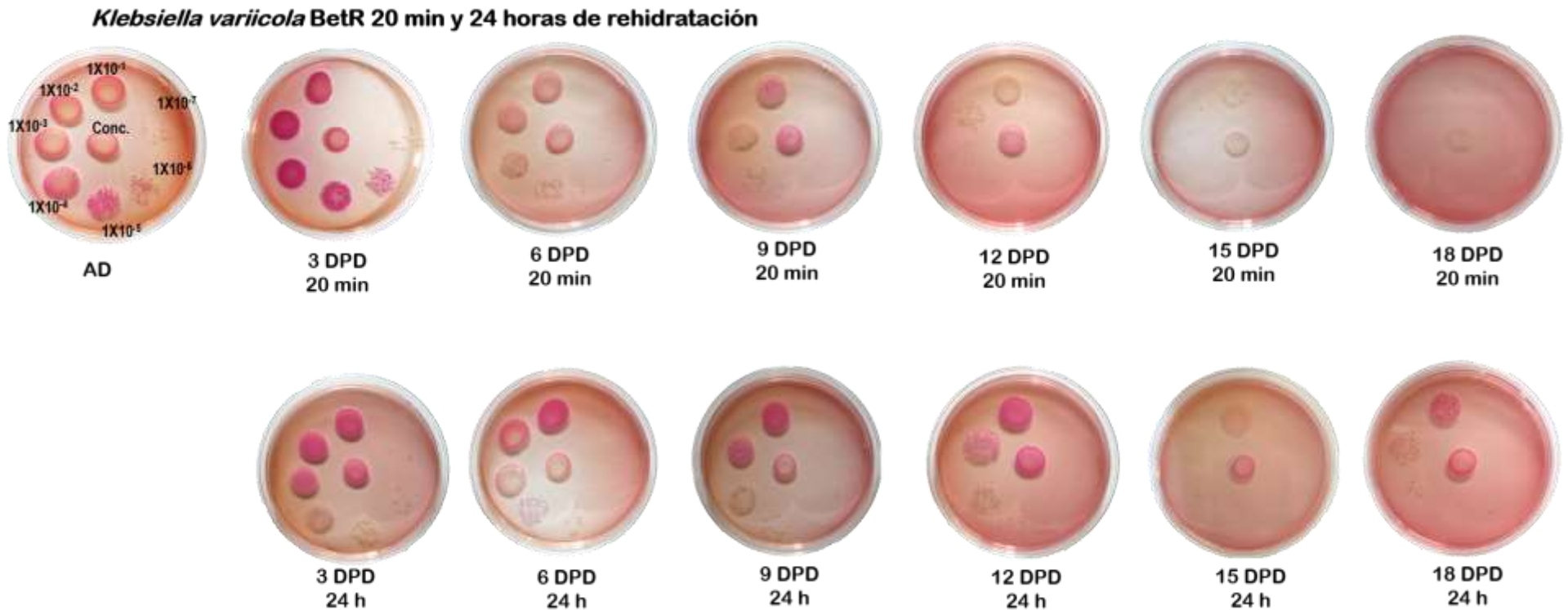


Figura 13. Restablecimiento en medio MacConkey de la cepa de *Klebsiella variicola* BetR desecada durante 18 días con rehidrataciones de 20 minutos y/o 24 horas. La cepa BetR fue precultivada/cultivada en medio LB y expuesta al estrés por desecación ambiental durante 18 días. Los monitoreos de viabilidad celular se ejecutaron antes de la desecación (AD) y cada tercer día hasta completar los 18 días posteriores a la desecación (DPD). Las células desecadas fueron rehidratadas por un periodo corto de 20 minutos o un periodo largo de 24 horas. La contabilización de UFC se efectuó utilizando el método de goteo en placa con medio MacConkey e incubación por 24 horas a 31°C.

Cuadro 3. Tasa de supervivencia bacteriana (BSR) de cepas bacterianas desecadas por durante 18 días y rehidratadas por 20 minutos o 24 horas. Las cepas T29A y BetR se precultivaron/cultivaron en medio LB y posteriormente fueron sometidas a desecación ambiental hasta por 18 días. El monitoreo de la viabilidad celular se realizó antes de la desecación (AD) y días posteriores a la desecación (DPD). Las cepas fueron rehidratadas por 20 minutos o 24 horas y el conteo de UFC se realizó mediante la técnica de goteo en placa con medio MacConkey. Después de 24 horas de incubación se contabilizaron las UFC y los datos obtenidos fueron utilizados para calcular la tasa de supervivencia bacteriana mediante la ecuación $BSR = [(Log UFC/ml PD+1) / Log UFC AD] \times 100$. Se muestra para cada dato de BSR la desviación estándar.

	BSR T29A		BSR BetR	
	20 minutos	24 horas	20 minutos	24 horas
0 AD	100	100	100	100
3 DPD	98.37±1.92	98.11±1.67	90.45±2.68	92.60±4.60
6 DPD	84.07±2.28	89.49±2.32	74.02±0.54	78.43±1.64
9 DPD	84.07±1.56	86.57±1.14	65.96±2.20	72.19±1.51
12 DPD	84.53±1.34	85.40±1.61	60.46±2.04	68.50±1.30
15 DPD	81.90±2.16	85.08±2.32	46.86±5.09	63.90±3.76
18 DPD	80.30±1.30	81.30±0.99	37.20±2.37	57.82±1.71

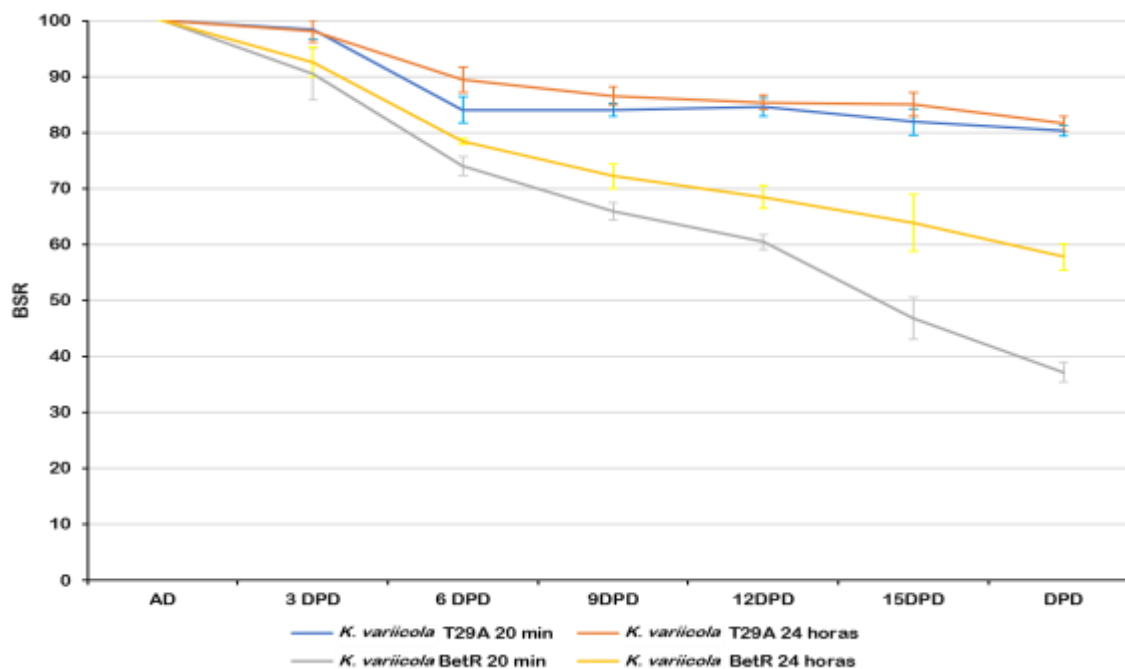


Figura 14. Representación gráfica de la tasa de supervivencia bacteriana (BSR) de las cepas de *Klebsiella variicola* T29A y BetR con rehidratación de 20 minutos (corta) y 24 horas (larga).

8.3 Análisis de la expresión genética en las cepas de *K. variicola* T29A y BetR sometidas a desecación ambiental.

Una vez caracterizadas las condiciones de cultivo y tiempo de rehidratación, se procedió a llevar a cabo el estudio de la expresión genética en células cultivadas en medio LB, lavadas, resuspendidas en agua estéril y sometidas a ensayos de desecación controlada a 30°C y 30-40% de HR durante doce días. El ARN total de los cultivos de ambas cepas de *K. variicola* T29A y BetR antes y después de la desecación fue purificado, sometido a síntesis y marcaje de ADNc con posterior hibridación a un sistema heterólogo de microarreglos de *E. coli* cepa K12 que contiene 4,608 genes (Fig. 15). El análisis de las imágenes de los microarreglos utilizando un corte de Z-Score de 2.0 reveló que la cepa T29A sometida a desecación por doce días presentó 135 genes *Up* regulados y 113 genes *Down* regulados. Mientras, que la cepa BetR desecada por doce días presenta 141 genes que están *Up* regulados y 60 genes *Down* regulados.

La clasificación por función de los genes *Up* regulados en la cepa T29A con tolerancia a la desecación reveló que básicamente existen 2 agrupaciones donde se clasifican genes que codifican para proteínas de membrana y genes que codifican para reguladores transcripcionales. Además, 86 genes no fueron agrupados dentro de estas dos categorías. Mientras, que la clasificación de genes por anotación asoció a los genes *Up* regulados en 15 categorías y 19 genes sin pertenecer a alguna agrupación (Fig. 16A y anexo 1). Básicamente, las agrupaciones con mayor número de genes regulados positivamente fueron los que codifican para proteínas de membrana que incluyen a transportadores ABC, facilitadores y proteínas de membrana externa (52 genes). Entre los otros grupos que tienen un número importante de genes *Up* regulados, está un conjunto con 27 genes relacionados con el metabolismo del carbono, glucólisis/gluconeogénesis y metabolitos secundarios; la categoría de genes que codifica para proteínas con dominios de unión o catálisis del ATP con 20 genes; el grupo de genes que codifica para proteínas que unen NAD con 18 genes, el conjunto de genes involucrados en la reparación y daño a ADN con 18 genes y la agrupación de genes codificantes para reguladores transcripcionales con 17 genes (Fig. 17A). Asimismo, los grupos con genes para el metabolismo de lípidos, hidrolasas de nucleótidos trifosfato,

proteínas con hierro/azufre, proteasas y transferasas de piridoxal fosfato, los cuales, tienen entre 3 y 6 genes. Para el caso de los 19 genes que no fueron agrupados estos codifican para proteínas hipotéticas, predichas o conservadas que aún no se conoce su función a detalle. En cuanto a los genes *Down* regulados en la cepa T29A se encontró que en la clasificación por función se formaron 4 grupos (lipoproteínas, proteínas que unen hierro/azufre, reguladores transcripcionales y proteínas de membrana) y 68 genes quedaron sin agrupación. En la clasificación por anotación se formaron 6 categorías y 27 genes sin agrupación (proteínas conservadas o predichas) (Fig. 16B y anexo 1). De nueva cuenta la categoría con mayor número de genes, pero en este caso regulados a la baja, correspondió a los que codifican para proteínas de membrana (40 genes), seguido del grupo de los genes codificantes para proteínas hipotéticas (27 genes). Las siguientes agrupaciones en orden descendente fueron el grupo de reguladores transcripcionales (19 genes), el grupo de genes que codifican para proteínas que usan hierro/azufre (14 genes), el grupo de los genes implicados en el metabolismo de lípidos (12 genes), el grupo de genes asociados reacciones de oxido-reducción (10 genes) y los grupos de unión del magnesio y al ATP (10 y 9 genes, respectivamente) (Fig. 17B).

Con lo que respecta a la cepa BetR sensible a la desecación se encontró que los genes *Up* regulados al igual que la cepa T29A se agrupan por función en genes que codifican para proteínas de membrana y reguladores transcripcionales, además de que 100 genes no fueron incluidos en estos dos grupos. Sin embargo, en la clasificación por anotación se obtuvo una categorización de 12 grupos (Fig. 18A y anexo 2), en donde el grupo de genes codificantes para proteínas de membrana incluidos transportadores de tipo ABC es al igual que en la cepa T29A el grupo más numeroso (49 genes). Posteriormente, le precede el conjunto de genes vinculados en el metabolismo del propanoato, glioxilato, piruvato, carbono, degradación de aminoácidos, ácidos grasos, biosíntesis de antibióticos y metabolitos secundarios (38 genes).

A**B**

Figura 15. Imagen de los microarreglos de ADN de las cepas de *Klebsiella variicola* T29A y BetR desecadas durante 12 días. (A) Microarreglo de la cepa T29A desecada con respecto a T29A antes de la desecación. (B) Microarreglo de la cepa BetR desecada en relación con BetR antes de la desecación. Los puntos amarillos representan los genes expresados en igual proporción antes y después de la desecación. Los puntos verdes indican los genes expresados antes de la desecación y los puntos rojos representan los genes expresados después de la desecación por 12 días.

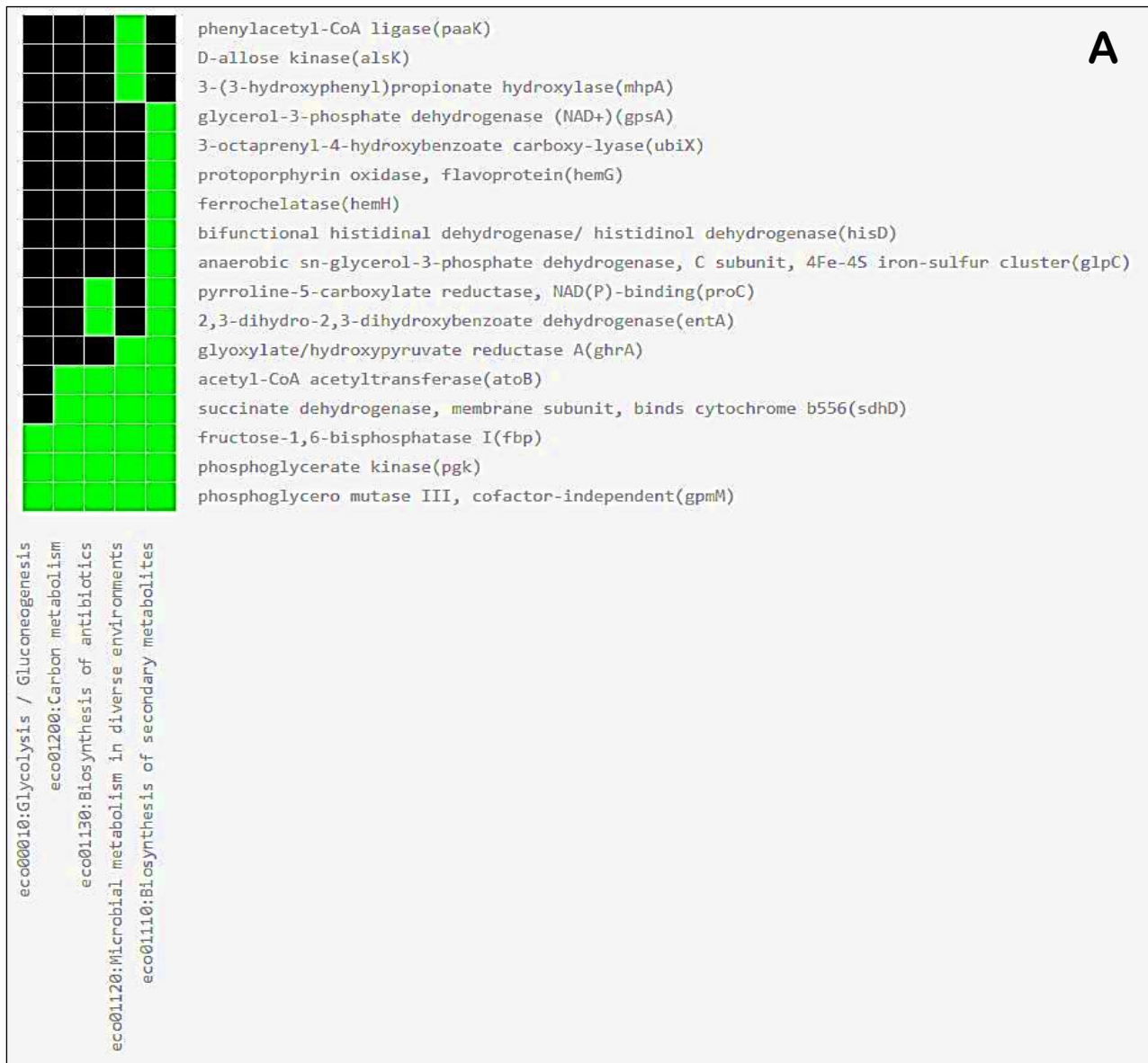


Figura 16 A. Clasificación por anotación de genes *Up* regulados de *Klebsiella variicola* T29A después de la desecación durante 12 días. La lista de genes *Up* regulados fue analizada en la plataforma DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) para identificar asociaciones de genes con múltiples anotaciones funcionales. Las gráficas 2D indican en color verde la asociación positiva de un gen con las anotaciones funcionales detectadas en la plataforma. El color negro indica ausencia de alguna relación entre el gen y la anotación funcional. Como ejemplo se muestra la gráfica de los genes *Up* regulados que forman el grupo 9: metabolismo del carbono, glucosa, gluconeogénesis y metabolitos secundarios.

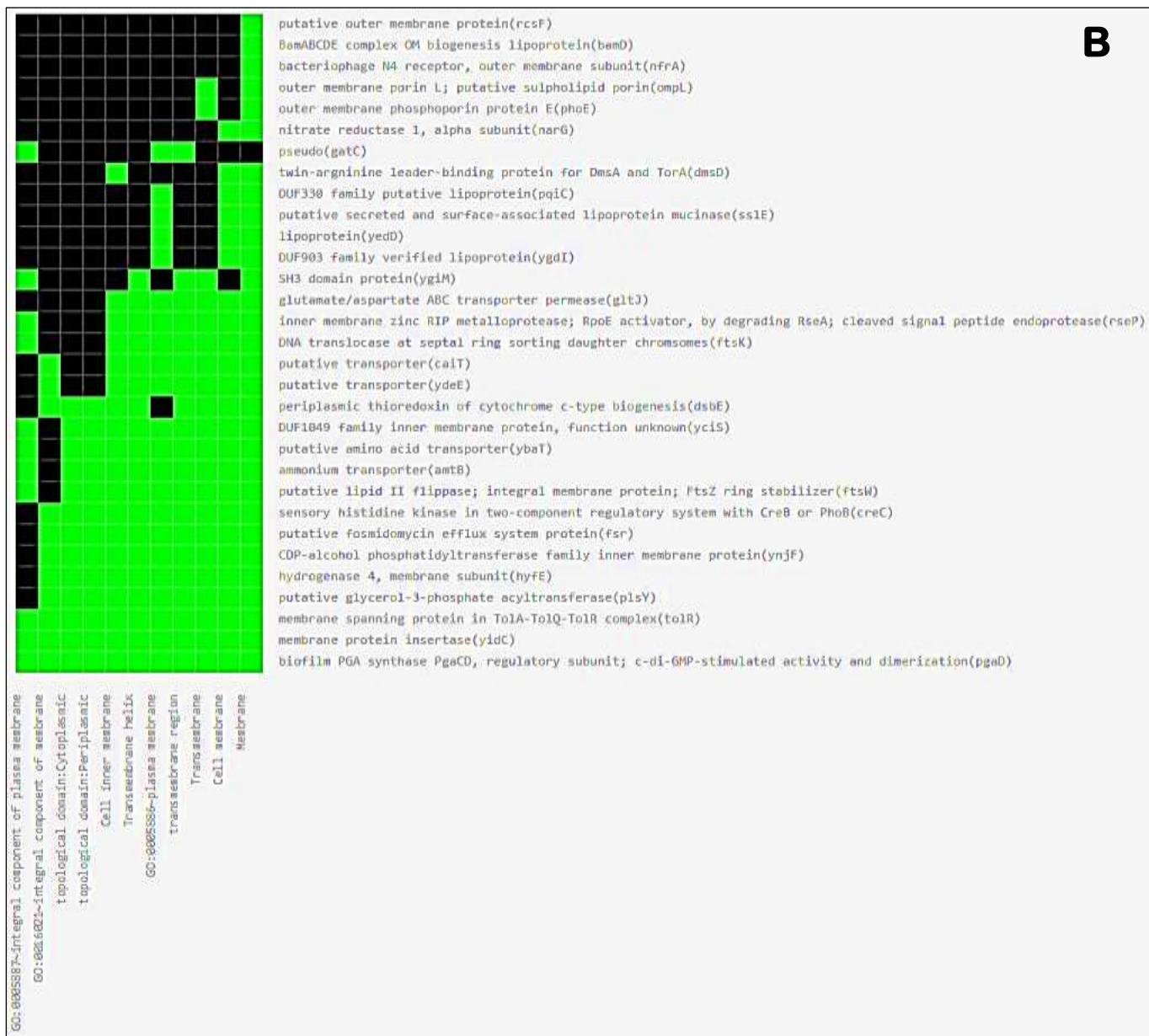


Figura 16 B. Clasificación por anotación de genes *Down* regulados de *Klebsiella variicola* T29A después de la desecación durante 12 días. La lista de genes *Down* regulados fue analizada en la plataforma DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) para identificar asociaciones de genes con múltiples anotaciones funcionales. Las gráficas 2D indican en color verde la asociación positiva de un gen con las anotaciones funcionales detectadas en la plataforma. El color negro indica ausencia de alguna relación entre el gen y la anotación funcional. Como ejemplo se muestra la gráfica de la agrupación de genes *Down* regulados que conforman el grupo 9: proteínas de membrana.

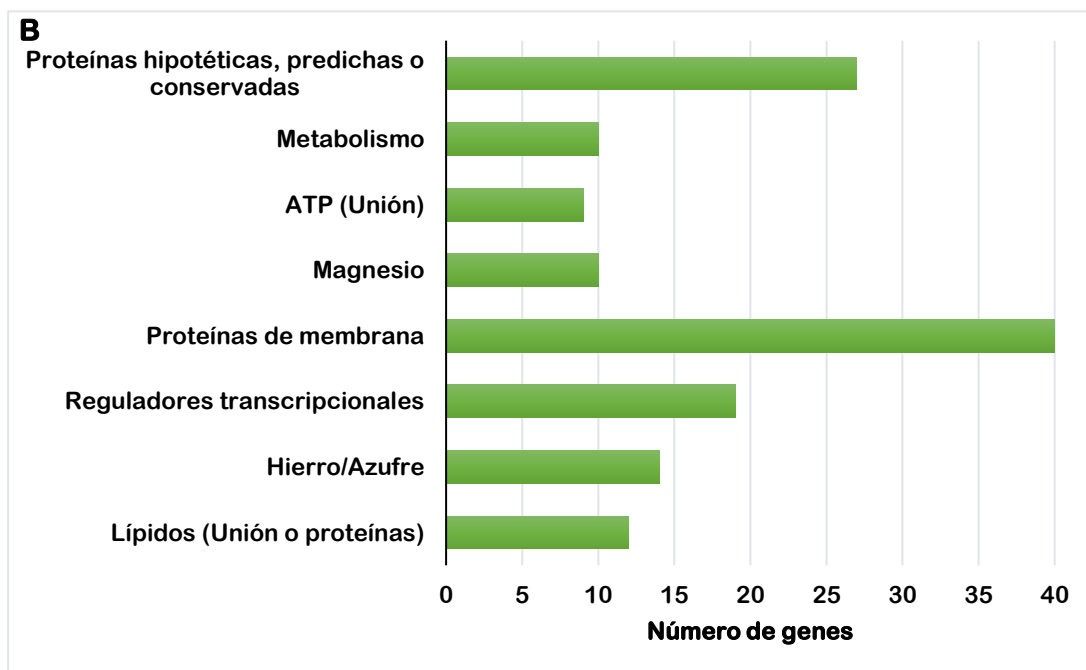
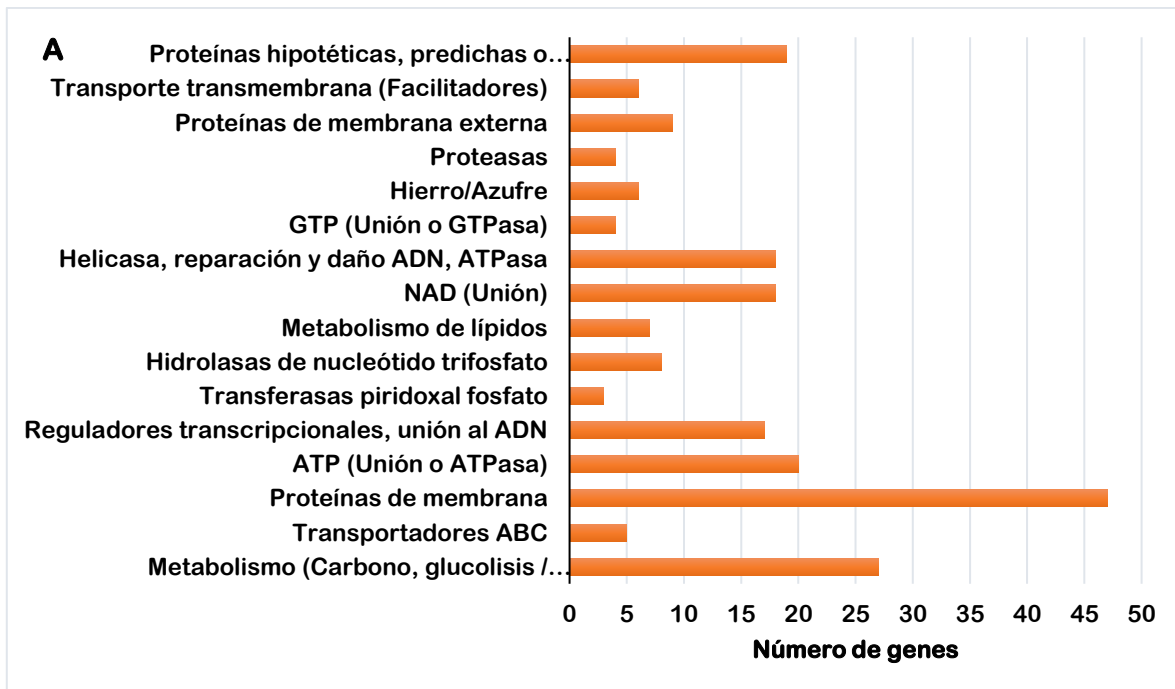


Figura 17. Representación gráfica de las agrupaciones por anotación de la cepa T29A desecada por 12 días. (A) Genes *Up* regulados. (B) Genes *Down* regulados. Se indica en número de genes con respecto a la categoría por anotación.

Continúan las agrupaciones de genes que codifican para proteínas que unen o hidrolizan ATP (21 genes), reguladores transcripcionales y unión al ADN (16 genes), recombinación de ADN (14 genes) e hidrólisis de nucleótidos trifosfato (10 genes). Los grupos con menor número de genes fueron el de reparación de ADN, metabolismo de lípidos, unión NAD⁺/FAD⁺ (oxidorreducción) y transferasas de piridoxal (entre 7 y 3 genes) (Fig. 19A). En el caso de los genes *Down* regulados para la cepa BetR la clasificación por función indicó que los genes pertenecen a dos grupos (síntesis de proteínas y componentes de membrana) y 45 genes no se relacionaron. En el ordenamiento de los genes por anotación se formaron cuatro agrupaciones y 15 genes quedaron sin asociación (Fig. 18B y anexo 2).

8.4 Comparación de los perfiles de expresión genética entre las cepas de *K. variicola* T29A y BetR sometidas a desecación.

Se realizaron análisis de microarreglos para determinar el perfil de expresión genética presente en la condición de tolerancia y sensibilidad al estrés por desecación. Con el objetivo de identificar patrones de expresión globales y genes particulares involucrados en las respuestas a la desecación se compararon los genes *Up* y *Down* regulados entre la cepa T29A y su mutante BetR. De manera global, ambas cepas tolerante y mutante sensible responden a la desecación aumentando la expresión de genes relacionados al metabolismo, transporte, proteínas de membrana, unión al ATP, reguladores transcripcionales o unión al ADN, transferasas de piridoxal e hidrólisis de nucleótidos trifosfato. Así como, un aumento en la expresión de genes codificantes para proteínas conservadas, predichas o hipotéticas, de las cuales aún no se tiene conocimiento detallado de su función. Además, en cada cepa se formaron agrupaciones de genes específicas para cada una de ellas, por ejemplo, en la cepa T29A la agrupación para un grupo grande de genes que codifican para proteínas con actividades relacionadas al metabolismo del ADN (helicadas, reparación y daño, actividad de ATPasa), proteínas que unen NAD, proteasas, proteínas con hierro/azufre y transportadores de tipo facilitador.

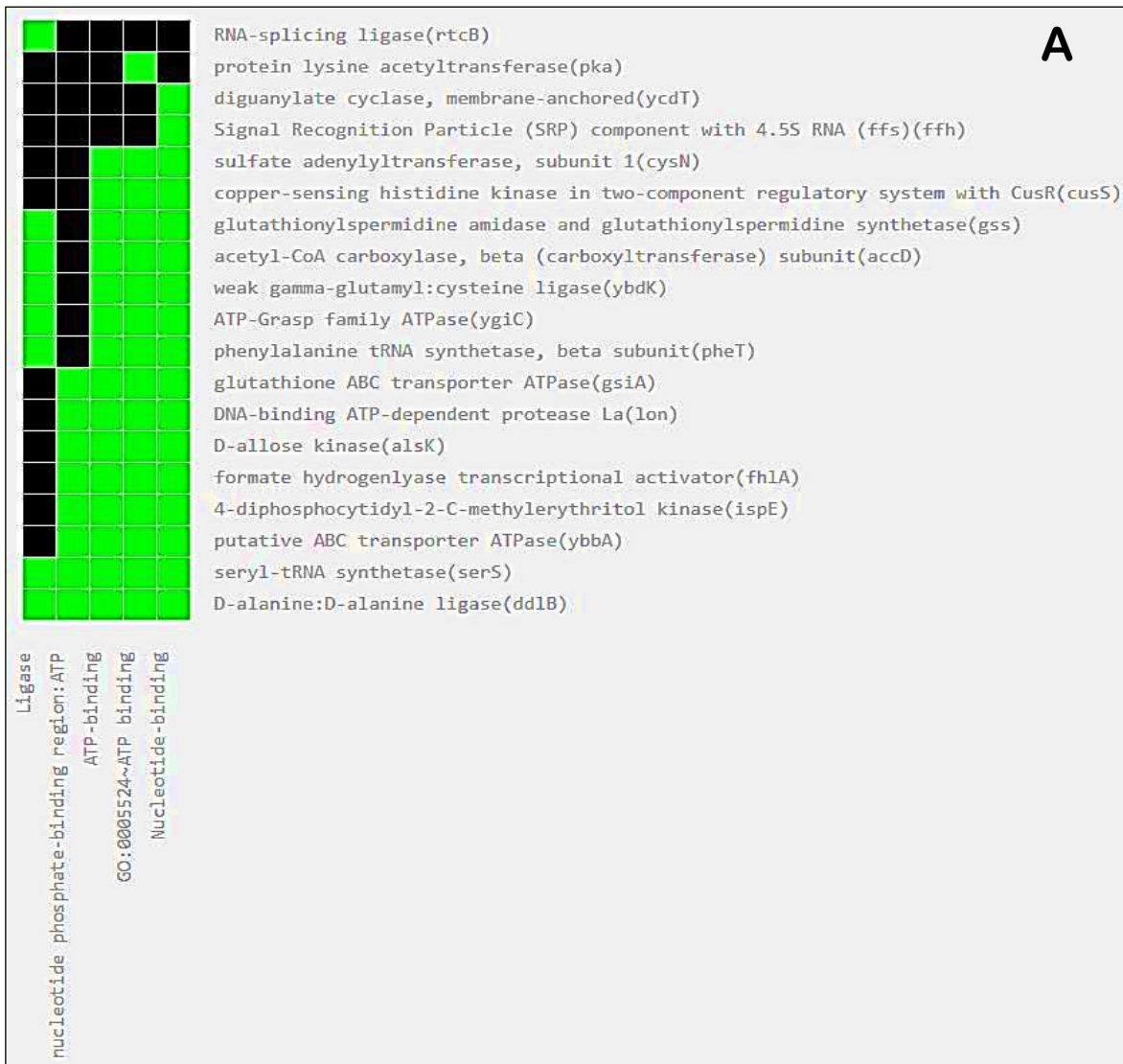


Figura 18 A. Agrupaciones por anotación de genes *Up* regulados de *Klebsiella variicola* BetR después de la desecación por 12 días. La lista de genes *Up* regulados fue analizada en la plataforma DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) para identificar asociaciones de genes con múltiples anotaciones funcionales. Las gráficas 2D indican en color verde la asociación positiva de un gen con las anotaciones funcionales detectadas en la plataforma. El color negro indica ausencia de alguna relación entre el gen y la anotación funcional. Se muestra como ejemplo la agrupación de genes *Up* regulados que conforman el grupo 6: ATP (unión o catálisis).

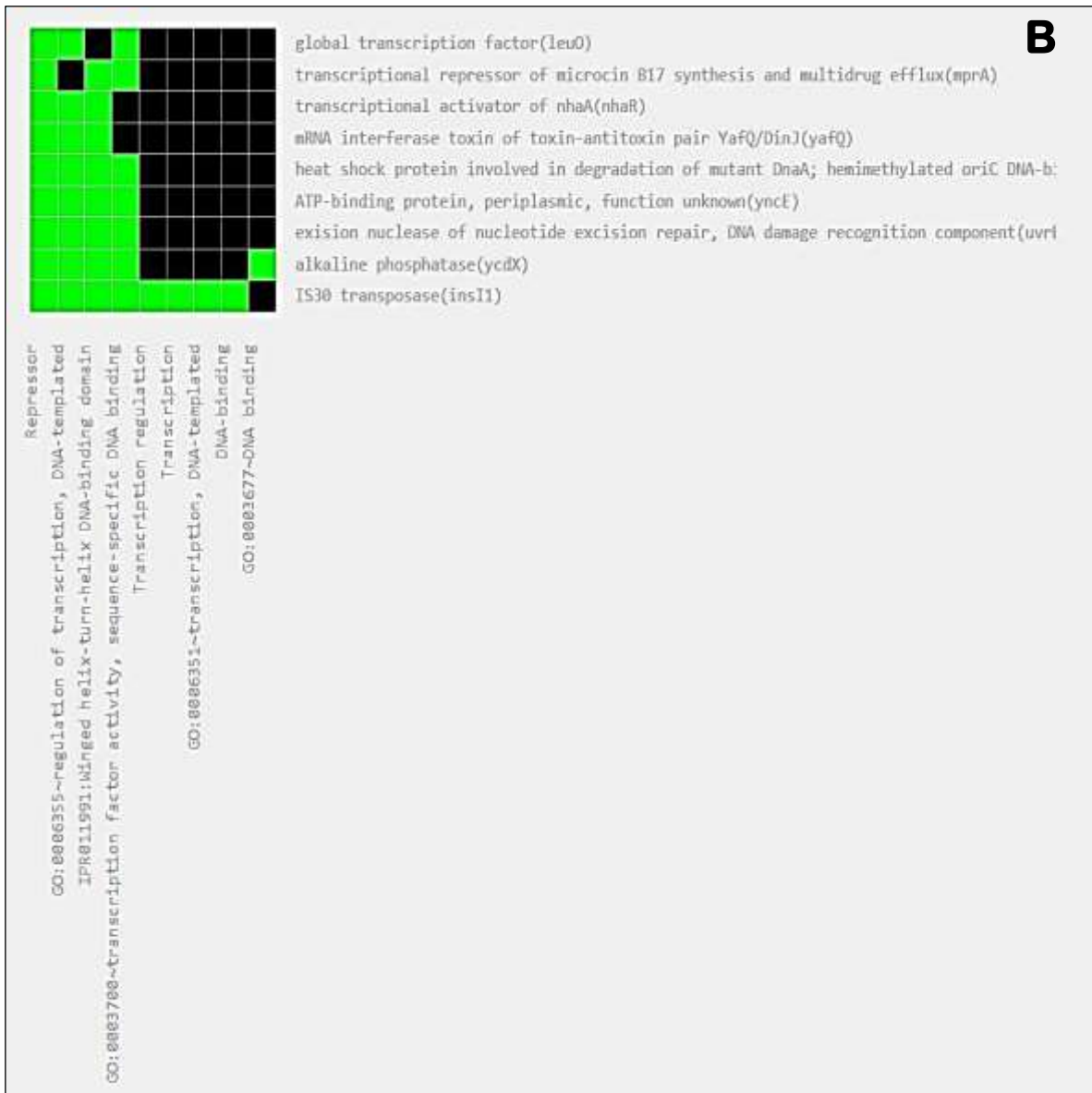


Figura 18 B. Agrupaciones por anotación de genes *Down* regulados de *Klebsiella variicola* BetR después de la desecación por 12 días. La lista de genes *Down* regulados fue analizada en la plataforma DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) para identificar asociaciones de genes con múltiples anotaciones funcionales. Las gráficas 2D indican en color verde la asociación positiva de un gen con las anotaciones funcionales detectadas en la plataforma. El color negro indica ausencia de alguna relación entre el gen y la anotación funcional. Se muestra como ejemplo la agrupación de genes *Down* regulados que constituyen el grupo 2: reguladores transcripcionales.

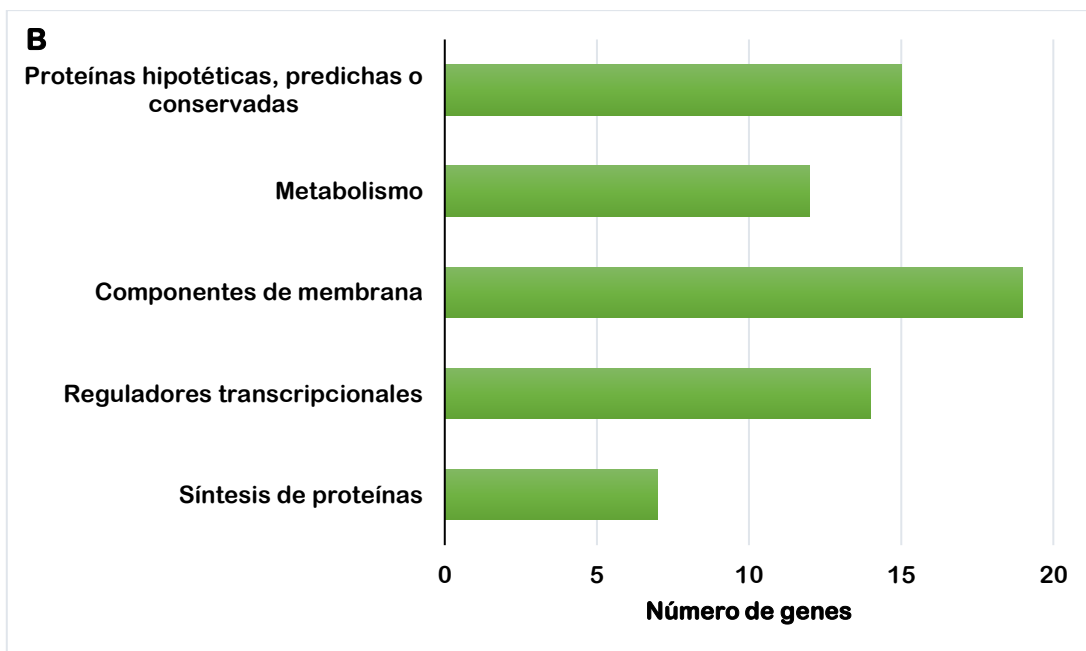
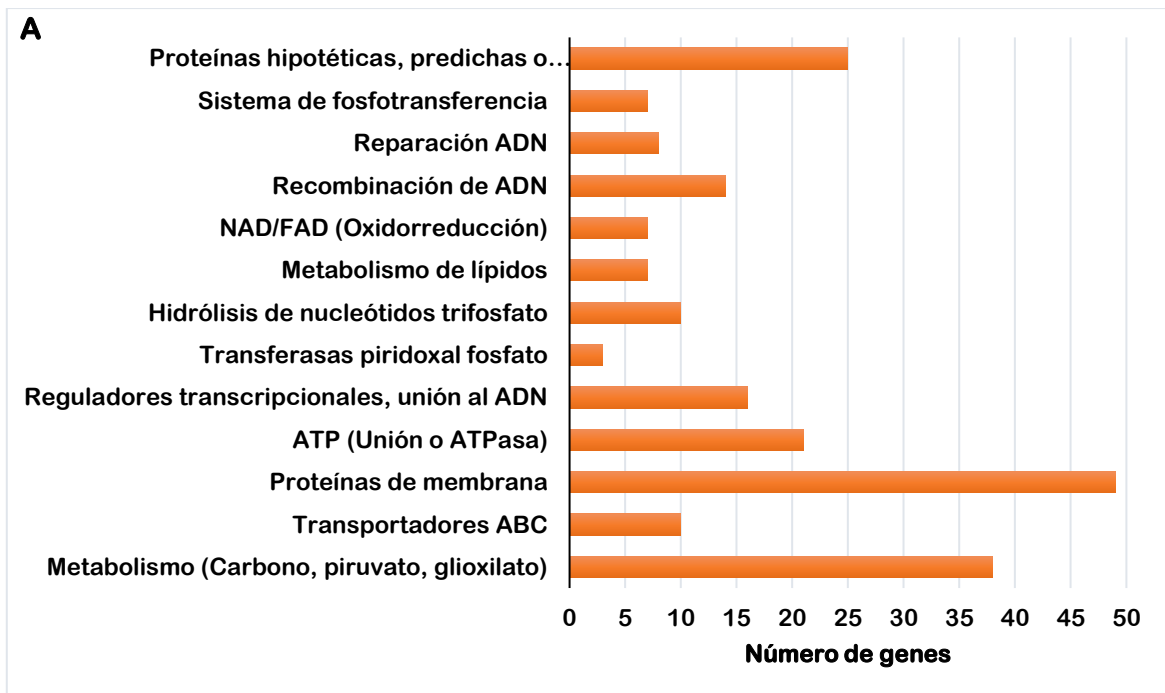


Figura 19. Categorización por anotación de genes *Up* y *Down* regulados de la cepa *Klebsiella variicola* BetR posterior al estrés por desecación durante 12 días. (A) Genes *Up* regulados. (B) Genes *Down* regulados. Se indica en número de genes con respecto a la categoría por anotación.

Mientras que en la cepa BetR se observan categorías para la recombinación y reparación del ADN, sistemas de fosfotransferencia y oxidorreducción. Considerando el número de genes por agrupación, en ambas cepas, la respuesta transcripcional a la desecación está dirigida a regular positivamente genes para control de las actividades de membrana celular, transporte, metabolismo, transcripción, reparación y recombinación de ADN (Figura 20).

De manera particular, en los genes *Up* regulados se encontró que 34 genes son expresados en ambas cepas sometidas a desecación durante doce días (Cuadro 4). Las categorías por anotación de este grupo de genes similares indicaron que codifican principalmente para proteínas con actividades como el transporte (genes: *ccmC*, *yidY*, *proW*, *yhdX*, b0832 o *gsiD*) y proteínas de membrana (genes: *ycdT*, *ycdW*, *yjiN*, *flu*, *wech*, *yghQ*, *nagE*). Seguido de la agrupación de reguladores transcripcionales (genes: *araC*, *ascG*, *rhaR*), actividad enzimática (*atoB*, *sodA*, *goaG*, *ybdB*) y unión a nucleótido (genes: *alsK*, *serS*, *ffh*). Estos resultados indicarían que la principal respuesta transcripcional similar a la desecación entre la cepa T29A tolerante y su mutante BetR sensible se manifiesta en el aumento de la expresión de genes para controlar actividades de la membrana celular a nivel de transporte y actividades enzimáticas.

Sin embargo, la expresión diferencial como respuesta a la desecación de cada cepa fue más relevante teniendo 101 genes *Up* regulados solo en la cepa tolerante T29A y 107 genes *Up* regulados únicamente en la cepa sensible mutante BetR (Fig 21A y B). La primera categoría con mayor número de genes de expresión diferencial para ambas cepas fue la categoría de genes codificantes para proteínas de membrana incluyendo los transportadores (entre 31 a 35 genes). Por ejemplo, en la cepa T29A solo se expresan genes como *ychM*, *ybjL*, *yieC*, *ygiU*, *yceL*, *ycdG*, *focB*, *UhpT*, *cynX*, *mhpT*, *oppF* que codifican para transportadores de sulfato, cationes, carbohidratos, simportador de serina/treonina:sodio, multidroga, pirimidinas, formiato y nitrito, hexosa-6-fosfato, cianato, ácido 3-hidroxifenilpropiónico y oligopéptidos, respectivamente.

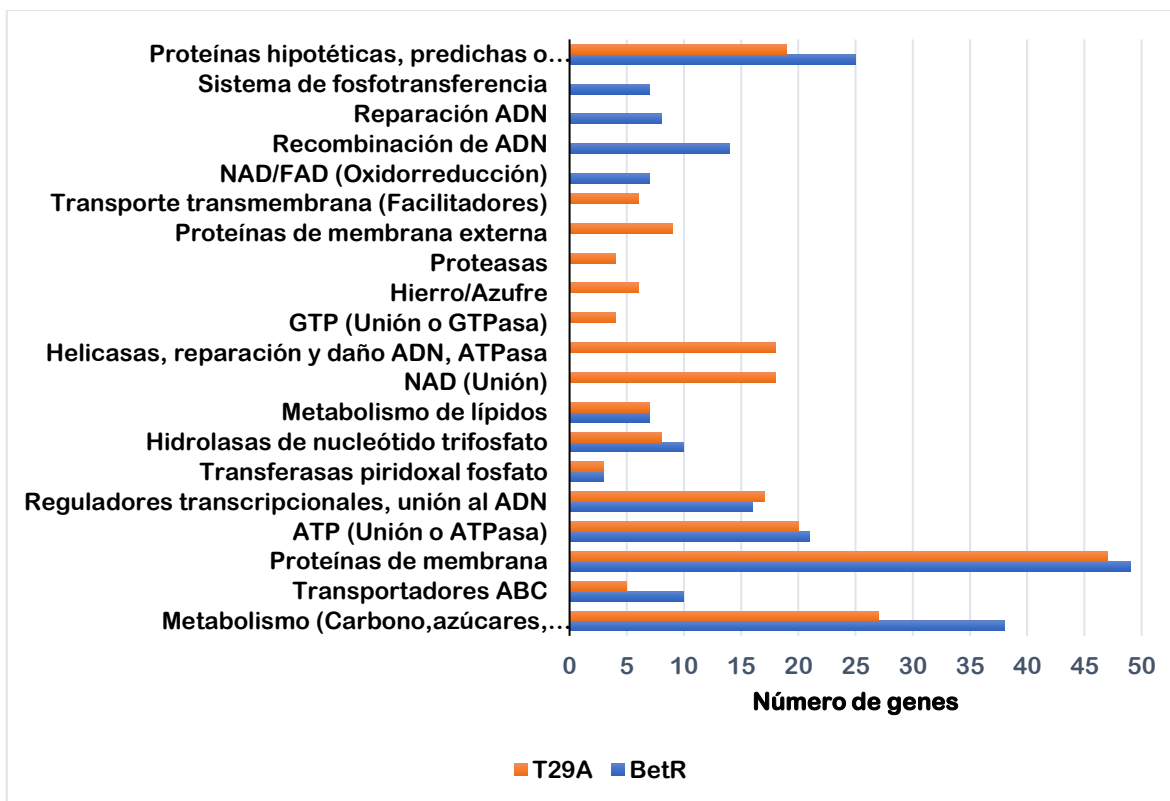


Figura 20. Comparación de categorías por anotación de genes *Up* regulados de las cepas *Klebsiella variicola* T29A y BetR sometidas a desecación durante 12 días.

También, están *Up* regulados los genes que codifican para proteínas de membrana con actividad enzimática, por ejemplo: *sdhD* (succinato deshidrogenasa), *lgt* (diacilgliceril transferasa), *pepN* (aminopeptidasa N), *yccC* (tirosina quinasa), *gpIC* (deshidrogenasa de glicerol-3-fosfato), *fixX* (ferredoxina). Además, genes que participan en diversos procesos como la homeostasis del fosfato (*phoU*), formación de biopelículas (*ygiD*), síntesis de flagelo (*ycfJ*), energización del motor flagelar (*fliG*) y regulación osmótica (*yggT*) también fueron *Up* regulados únicamente en la cepa T29A tolerante a la desecación.

Cuadro 4. Clasificación por anotación de los genes *Up* regulados que se expresan en ambas cepas T29A y BetR posterior a la desecación ambiental de 12 días.

Categoría	Id	T29A Z-score	BetR Z-score	Función
Transporte	<i>ccmC</i>	6.116	2.958	Subunidad de un exportador de hemo perteneciente a la familia ABC
	<i>yidY</i>	2.468	2.581	Proteína del sistema de eflujo de multidrogas
	<i>b0832</i>	3.069	4.098	Importador de Glutación, permeasa transportador ABC (<i>gsiD</i>)
	<i>yhdX</i>	2.420	2.737	Supuesto transportador de aminoácidos de tipo ABC, subunidad componente de membrana
	<i>yhaO</i>	2.815	2.192	Permeasa de aminoácidos putativa, transportador ABC
	<i>proW</i>	2.480	2.933	Permeasa de glicina/betaína, transportador ABC
Proteínas de membrana	<i>ycdW</i>	2.260	2.130	Glioxilato/hidroxipiruvato reductasa A
	<i>flu</i>	3.940	2.219	Autotransportador para la formación de biopelícula de fase variable
	<i>yjiN</i>	2.182	2.531	Proteína de membrana interna
	<i>b0832</i>	3.069	4.098	Importador de Glutación, permeasa transportador ABC (<i>gsiD</i>)
	<i>ftsN</i>	2.325	2.535	Proteína esencial de la división celular
	<i>yiaH</i>	2.364	2.455	O-acetiltransferasa predicha
	<i>ccmC</i>	6.116	2.958	Subunidad de un exportador de hemo perteneciente a la familia ABC
	<i>yghQ</i>	3.247	2.488	Flipasa de polisacáridos de membrana
	<i>ycdT</i>	5.417	3.361	Diguanilato ciclasa anclada a membrana
	<i>yidY</i>	2.468	3.581	Proteína del sistema de eflujo de multidrogas
	<i>yhaO</i>	2.815	2.192	Permeasa de aminoácidos putativa, transportador ABC
	<i>proW</i>	2.480	2.933	Permeasa de glicina/betaína, transportador ABC
	<i>yhdX</i>	2.420	2.737	Supuesto transportador de aminoácidos de tipo ABC, subunidad componente de membrana
	<i>nagE</i>	2.273	2.542	Componente del sistema de fosfotransferencia de N-acetilglucosamina
<i>lgt</i>	2.600	2.927	Fosfatidilglicerol - prolipoproteína diacilgliceril transferasa	
Reguladores transcripcionales	<i>araC</i>	2.034	2.611	Activador transcripcional del regulón ara; autorrepresor
	<i>ascG</i>	2.527	2.829	Represor del operón críptico (<i>ascFB</i>) cuyos genes están involucrados en el transporte y la utilización de los azúcares glucósidos arbutina, salicina y celobiosa
	<i>rhaR</i>	2.167	2.340	Activador transcripcional de <i>rhaSR</i>
Unión a nucleótido	<i>gsp</i>	2.487	2.317	Glutación espermidina sintasa
	<i>serS</i>	3.192	2.614	serina-tRNA sintasa
	<i>yjcT</i>	4.034	2.967	D-alosa quinasa

	<i>ffh</i>	3.037	4.452	Componente de partícula de reconocimiento de señal (SRP) con ARN 4.5S (<i>ffs</i>)
	<i>ycdT</i>	5.417	3.361	Diguanilato ciclasa anclada a membrana
	<i>ybbA</i>	2.233	2.433	Componente de unión a ATP de un transportador de captación de metabolitos de la superfamilia ABC predicha
Actividad enzimática	<i>b2253</i>	4.176	2.883	Uridina 5´-(beta-1-treo-pentapiranosil-4-ulosa difosfato) aminotransferasa dependiente de PLP
	<i>goaG</i>	2.077	2.383	4-aminobutirato transaminasa (<i>puuE</i>)
	<i>gspA</i>	2.905	3.238	glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
	<i>sodA</i>	2.484	2.524	Superóxido dismutasa, Mn
	<i>ybdB</i>	2.061	2.216	Tioesterasa involucrada en la síntesis de enterobactina
	<i>ycdW</i>	2.260	2.130	Glioxilato/hidroxipiruvato reductasa A (<i>ghrA</i>)
	<i>yiaH</i>	2.364	2.455	O-acetiltransferasa predicha
	<i>atoB</i>	3.279	3.009	acetil-CoA acetiltransferasa
Proteínas hipotéticas, predichas o conservadas	b0165	4.116	4.072	Proteína hipotética
	b2970	2.444	2.026	Proteína predicha de vía secretoria

Por otra parte, entre los genes *Up* regulados codificantes para transportadores de membrana que solo se expresan en la cepa BetR están *artQ* y *proY* (permeasas para arginina y prolina), *gsiA* (glutación), *ytfT* (azúcares), *cmtB* (manitol), *murP* (N-acetil murámico), *amtB* (amonio), *yncD* (hierro), *yhiV* (multidrogas) y *miaB* (asimetría de lípidos de membrana externa). La segunda categoría de genes *Up* regulados diferencialmente más relevante en cuanto a número de genes es la correspondiente a reparación y recombinación de ADN. Se encontró que la respuesta transcripcional de la cepa T29A incluyó la regulación positiva de *recQ* y *recG* que codifican para dos potentes helicasas dependientes de ATP que desenrollan el ADN facilitando el despeje o regresión de horquillas de replicación bloqueadas para que la síntesis de ADN pueda continuar. Asimismo, como parte de los genes *Up* regulados están *yigN* y *mfd* que codifican para una proteína que limita la recombinación y para un factor que acopla la transcripción con la reparación de ADN.

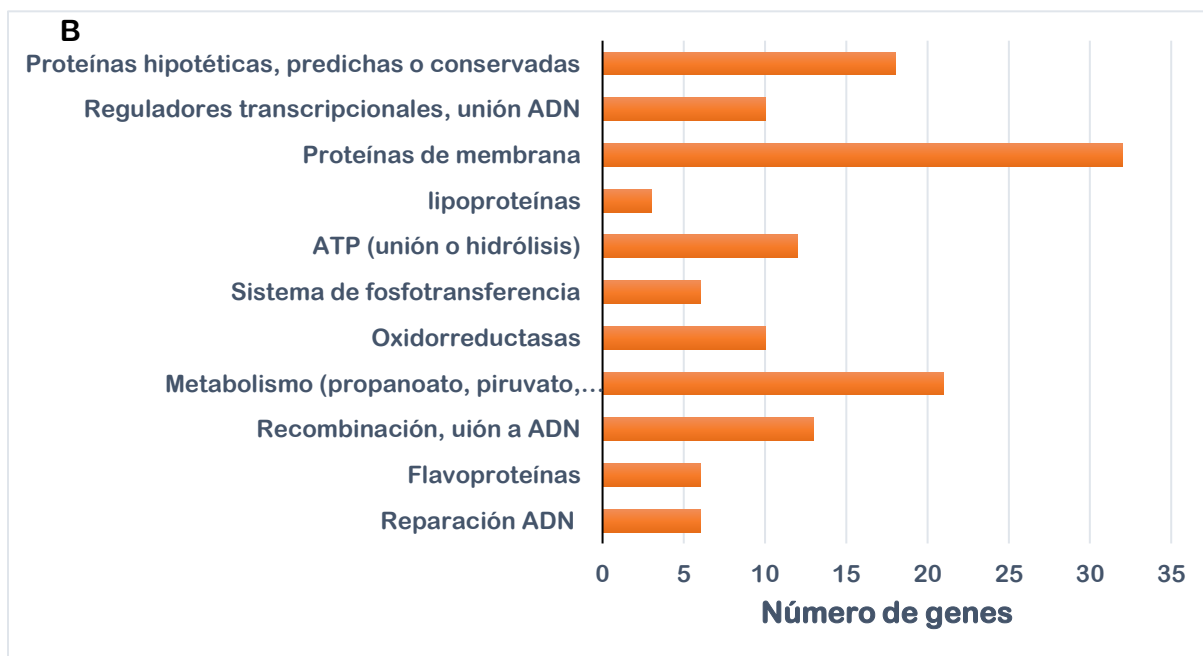
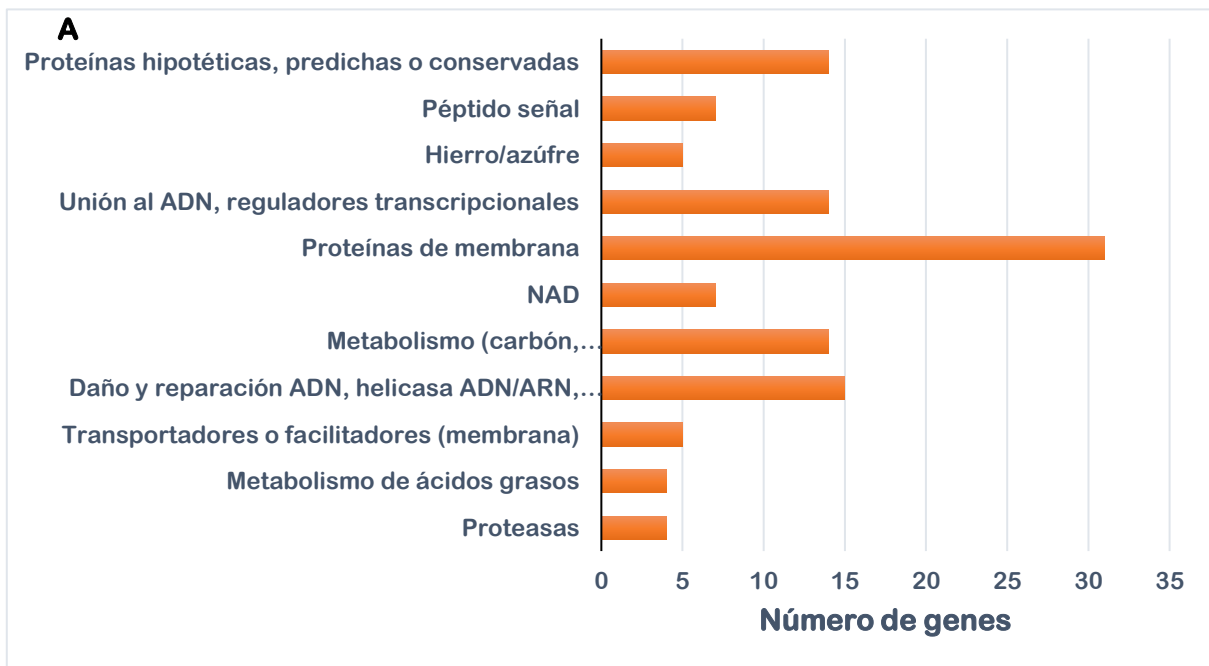


Figura 21. Expresión diferencial genes *Up* regulados en las cepas T29A y BetR sometidas a desecación por 12 días. (A) Genes *Up* regulados que solo se expresan en la cepa T29A. (B) Genes *Up* regulados de expresión específica de la cepa BetR.

Por otra parte, dentro de esta categoría para el caso de la cepa T29A se incluyeron los genes que codifican para proteínas que hidrolizan nucleótidos cuyas actividades están relacionadas a la transcripción y procesamiento de ARN (*rtcB*, *rho*, *ybiM*). Con respecto a la cepa mutante BetR, la respuesta transcripcional referente a recombinación de ADN se encontró en el aumento de la expresión de genes que codifican para transposasas e integrasas (*b1432*, *yhhI*, *himD*, *b1445*, *intD*). Conjuntamente, otros genes *Up* regulados fueron *recR* (recombinación y reparación de ADN independientes de *recBC*) y *umuC* (subunidad de la ADN polimerasa V propensa a errores).

La tercera categoría de expresión diferencial más relevante en cuanto número de genes fue la de metabolismo, observándose que la cepa T29A respondió a la desecación con el aumento en la expresión de genes para la glicólisis/gluconeogénesis (*fbp*, *pgk*, *gpmM*), la síntesis de antibióticos (*proC*, *entA*), procesamiento de metabolitos secundarios (*glpC*, *hisD*, *hemH*, *hemG*, *ubiX*) y metabolismo de ácidos grasos (*fabB*, *fabH*, *wcaB*). Por su parte, la cepa BetR respondió a la desecación con la regulación positiva de genes para el metabolismo del propanoato (*scpA*, *accD*, *yqeF*), del piruvato (*aceF*), la síntesis de antibióticos (*metC*, *ilvI*, *ispE*, *adhP*) y diferentes vías metabólicas (*betA*, *treA*, *ulaE*, *tktB*). Cabe resaltar que, la categoría de las proteínas hipotéticas, conservadas o predichas son un grupo importante en la respuesta transcripcional diferencial de ambas cepas ya que también se encuentran de igual manera en la tercera categoría más relevante de genes *Up* regulados expresados diferencialmente. Como ejemplo, para la cepa T29A los genes *b1777*, *AAC74858* y *b2655* se destacan por su elevado aumento en la transcripción. En la cepa BetR los genes *yaiE*, *ybaA*, *ydcC* y *yfgA* tuvieron un notable aumento en su expresión genética. La cuarta categoría de importancia por número de genes es la de reguladores transcripcionales y proteínas de unión al ADN. En la cepa tolerante a la desecación T29A se detectó una sobreexpresión diferencial de los genes *narL*, *rhaH*, *alsR* y *racR* (activadores y represores transcripcionales). Mientras que para la cepa sensible BetR el aumento en la expresión se identificó para *yidP*, *bdcR*, *fhIA* y *soxS* (activadores y represores de la

transcripción). No obstante, para la cepa BetR la categoría de unión al ATP asoció a un conjunto de genes de relevancia en cuanto a número se refiere, ya que incluso este grupo posee mayor número de genes que la categoría de reguladores transcripcionales. Los genes que conforman esta agrupación codifican para proteínas con diversas actividades como ATPasa (*yjiL*, *ygiC*), acetiltransferasa de lisina (*pka*, *yfiQ*), carboxiltransferasa (*accD*), tRNA-sintetasas de fenilalanina (*pheT*), glutatión espermidina sintasa (*gsp*) e histidina quinasa (*ybcZ*).

Las categorías restantes presentaron agrupaciones con un número reducido de genes (3 a 10) regulados positivamente, sin embargo, cada cepa tuvo sus propias agrupaciones de expresión diferencial. De esta manera, para la cepa T29A se formaron grupos específicos como el de genes codificantes de proteínas con péptido señal localizadas en la membrana externa (*fkpA*, *yfhG*, *ylcD*, *yieC*) y el conjunto de genes que codifican para proteínas que unen hierro/azufre (*glpC*, *fixX*, *thiC*, *sdhD*, *hemH*, *dps*). Conjuntamente, el grupo de genes que codifica para proteínas con actividades de oxido reducción (*kduD*, *entA*, *hisD*) y de proteasas (*pepN*, *ptrB*, *sohB*, *clpP*). En el caso de la cepa BetR las categorías de expresión diferencial con menor número de genes fueron el grupo de flavoproteínas (*chrR*, *gor*, *ilvI*, *fixB*, *betA*, *ndh*), oxidorreductasas (*ygfF*, *ftnA*, *qorA*, *adhP*) y lipoproteínas (*nlpC*, *yeaY*, *yafY*).

Por otra parte, contrastando los perfiles de expresión genética de los genes *Down* regulados se encontró que en las dos cepas principalmente disminuye de la expresión de genes que codifican para proteínas de membrana, proteínas hipotéticas y reguladores transcripcionales. También, cada cepa presentó agrupaciones específicas de genes *Down* regulados. Para la cepa T29A destacan las agrupaciones de proteínas con hierro/azufre, unión/hidrólisis de nucleótidos y unión al magnesio (Figura 22A). Mientras que en la cepa BetR las agrupaciones específicas fueron las categorías de transcripción/unión al ADN y ribosoma/traducción/unión al ARN (Figura 22B).

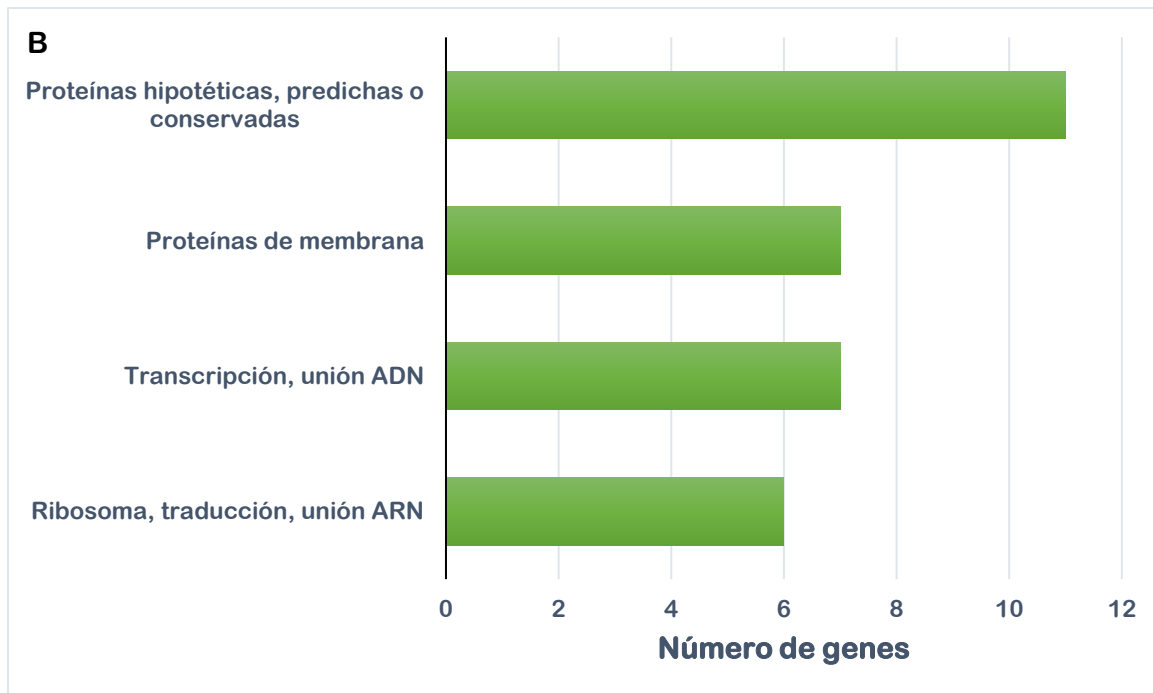
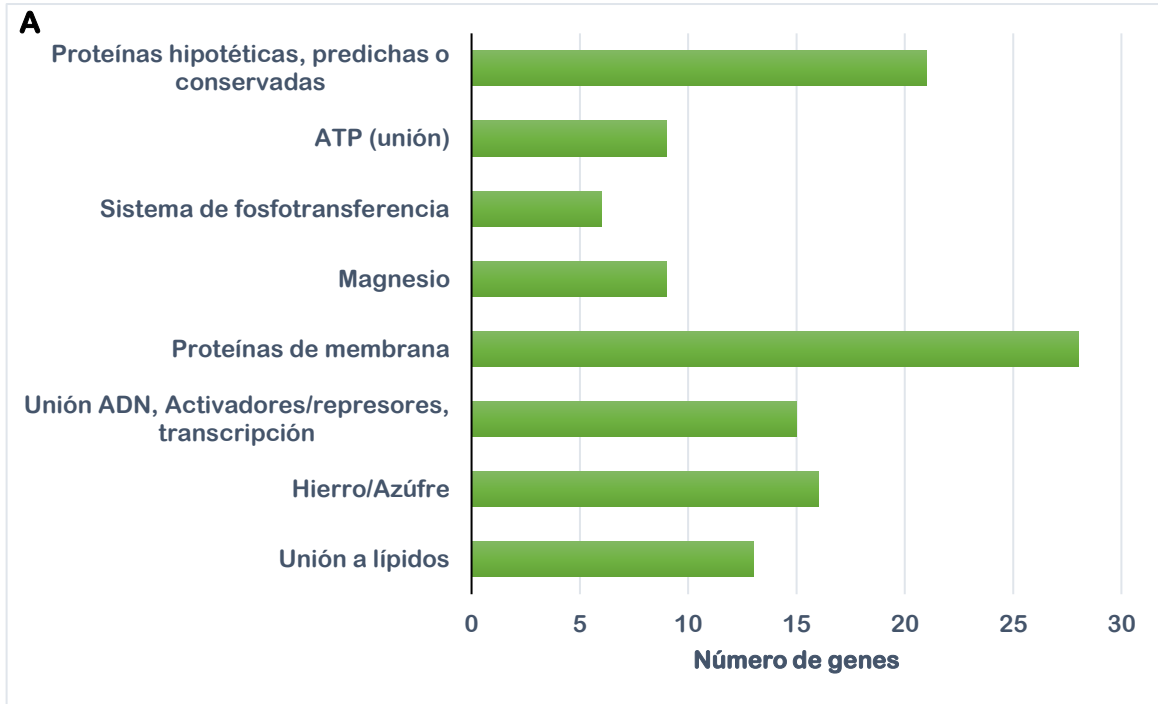


Figura 22. Expresión diferencial genes *Down* regulados en las cepas T29A y BetR sometidas a desecación por 12 días. (A) Genes *Down* regulados que solo se expresan en la cepa T29A. (B) Genes *Down* regulados de expresión específica en la cepa BetR.

9. Discusión

Es un hecho innegable la importancia del agua en el soporte de la vida en el planeta tierra, ya que, si los seres vivos equilibraran su contenido interno de agua con el aire moderadamente seco les ocasionaría la muerte instantánea (. De hecho, cuando los organismos pierden agua de manera extrema, las membranas biológicas y las macromoléculas sufren agregación de manera irreversible favoreciendo la desintegración de estructuras celulares (Alpert, 2005; Clegg, 1973; Crowe, 1971). Sin embargo, la evolución de la vida en ambientes terrestres implicó la selección de organismos con poderosas adaptaciones para tolerar la desecación, sobrevivir y no morir ante el estado seco (0.1 g de agua por gramo de masa seca). Los organismos tolerantes a la desecación, anhidrobiontes y/o xerotolerantes se distinguen ya que tienen la notable capacidad de soportar la pérdida casi absoluta de agua sin sufrir daños irreparables y continuar con las actividades metabólicas normales luego de la rehidratación (Billi y Potts, 2000). Por lo anteriormente dicho, los anhidrobiontes naturalmente tolerantes a la desecación han sido tomados como prototipos de estudio para conocer todos los aspectos de la biología anhidra y como buena fuente de recursos genéticos para transferir la tolerancia a la desecación a organismos de importancia ecológica y económica ante una mayor sequía pronosticada (Costa *et al.*, 2016). Al respecto, el abordaje experimental para analizar respuestas transcripcionales en organismos desecados ha sido una de las formas para identificar los principales genes y mecanismos relacionados con la tolerancia a la desecación (Cytryn *et al.*, 2007; Deng *et al.*, 2012; Gulez *et al.*, 2012; Katoh *et al.*, 2004; LeBlanc *et al.*, 2008). Por lo tanto, en el presente trabajo tomando como modelo de estudio a dos cepas de *Klebsiella variicola* (una tolerante natural y otra sensible artificial a la desecación) se planteó estudiar la tolerancia y/o sensibilidad a la desecación en diferentes condiciones de cultivo y rehidratación con el objetivo

de analizar los perfiles globales de expresión genética a largo plazo después de doce días de desecación ambiental.

En primera instancia, se encontró que la cepa silvestre T29A es tolerante a la desecación hasta los 18 DPD independientemente del medio de cultivo mínimo o rico (MM9-Glucosa y LB, respectivamente) con el que se crezca AD y del medio en el que se recupere (MM9-Glucosa y LB) después de la rehidratación corta (20 minutos) o larga (24 horas). Además, se observó una mejor capacidad de restablecimiento posterior a la desecación/rehidratación si las bacterias son recuperadas en el mismo medio en el que se cultivan. En general, la cepa silvestre mostró una mejor BSR (99.48 ± 0.75 a 84.23 ± 2.37) en la condición de cultivo en medio LB antes de la desecación y recuperación en el mismo medio. El cambio de cultivo de medio LB a medio MM9-Glucosa para la recuperación no afectó la BSR (98.57 ± 2 a 83.98 ± 1.8) pero si retardó el crecimiento de UFC por 48 horas. En cuanto al cultivo en medio MM9-Glucosa y recuperación en el mismo medio se obtuvo una BSR de 99.84 ± 0.76 a 80.2 ± 2.59 y para la recuperación en medio LB la BSR fue de 98.94 ± 0.75 a 79.06 ± 1.6 , indicando que el cambio de medio podría afectar la efectividad de recuperación después de la rehidratación.

Referente a la cepa mutante BetR, se corroboró su sensibilidad a la desecación, la cual fue más evidente cuando se cultivó en medio mínimo MM9-Glucosa y se recuperó en medio rico LB (BSR 91.2 ± 0.5 a 0.0). El decaimiento de la BSR de la cepa BetR comenzó de manera drástica a partir de los 6 DPD (44.8 ± 5.6) cuando la pérdida de agua fue total, subsiguientemente, la BSR continuó disminuyendo hasta niveles de 0.0 a partir de los 12 DPD hasta los 18 DPD. Cuando la recuperación se realizó en medio MM9-Glucosa se observó el mismo comportamiento, aunque con una mejora en la BSR a los 3, 6 y 9 DPD indicando nuevamente una mejor capacidad de respuesta cuando las células son cultivadas y recuperadas en el mismo medio. Con lo que respecta al cultivo en medio LB y recuperación en medio LB se determinó una BSR de 94.8 ± 2.96 a 7.15 ± 3 a los 15 DPD revelando una competencia superior para tolerar la desecación que la condición de cultivo en medio MM9-Glucosa. Además, en este caso el restablecimiento después de la

rehidratación en medio MM9-Glucosa la BSR no decayó a 0.0 aun después de los 18 DPD (93.85 ± 1.69 a 30 ± 7.37) indicando que la cepa sensible puede contender mejor al estrés por desecación cuando es rehidratada y reestablecida en medio MM9-Glucosa.

Este efecto diferencial del medio de cultivo en la capacidad para tolerar la desecación ya ha sido observado en otras bacterias. Al respecto, se ha encontrado que en el género *Rhizobium* la tolerancia a la desecación varía dependiendo de las especies y cepas, de las condiciones de crecimiento y del proceso de desecación (Deaker *et al.*, 2012). De hecho, la supervivencia de los rizobios desecados e inoculados en semillas incrementa significativamente cuando son cultivados en turba sólida o acuosa que cuando son crecidos en medios líquidos (JMM y TY). La mejora en la supervivencia y adaptación fisiológica para contender al estrés por desecación se ha atribuido a que los rizobios cultivados en turba sólida son protegidos por una cápsula de partículas de turba que rodea a las semillas o por un engrosamiento de la pared celular de los rizobios (Feng *et al.*, 2002). También, mediante un estudio de proteómica se ha encontrado que el crecimiento en turba expone a los rizobios a un estrés subletal causando daño en las membranas celulares, sin embargo, este estrés provoca una regulación positiva de proteínas que reparan las membranas celulares y predisponen a las bacterias a tolerar la desecación con mejor capacidad. Dentro de estas proteínas expresadas en los rizobios cultivados en turba están transportadores ABC, proteínas de transcripción y traducción, proteínas de estrés oxidativo, proteínas de choque térmico/choque frío, proteínas de choque de fagos, proteínas para metabolismo de trehalosa, proteasas, chaperoninas y proteínas ribosómicas. Particularmente, la proteína de choque de fagos PspA tiene un papel fundamental, ya que su actividad estaría encaminada a reparar las membranas dañadas después del crecimiento con turba. Se propone que el crecimiento en turba puede tener un efecto de primación o preacondicionamiento que otorga una protección cruzada para condiciones de estrés posteriores (Atieno *et al.*, 2018).

Conjuntamente, para conocer la capacidad de respuesta a la desecación/rehidratación también se realizó un estudio sobre el tiempo de hidratación examinando un periodo corto (20 minutos) o largo (24 horas) en ambas cepas T29A y BetR. Para este ensayo de desecación el cultivo se realizó en medio LB y el restablecimiento en medio selectivo MacConkey, ya que debido a su composición se tendría evidencia indirecta de la actividad metabólica (Allen, 2005) de las cepas T29A y BetR desecadas/rehidratadas por tiempo corto o largo. Sobre esto, el agar MacConkey se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram-negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos. En virtud de su composición (peptona, sales biliares y lactosa) es empleado como medio de cultivo para diferenciación de organismos fermentadores (colonias rosas-rojas) y no fermentadores de lactosa (colonias incoloras). También, el agar MacConkey inhibe el crecimiento de bacterias Gram-positivas (MacConkey, 1905; Holt y Kreig, 2000). Para la cepa T29A con desecación/rehidratación por 20 minutos se obtuvo desde los 3 DPD a los 18 DPD una BSR de 98.37 ± 1.92 a 80.3 ± 1.3 , la cual mejoró sutilmente con 24 horas de contacto con el agua de 98.11 ± 1.67 a 81.30 ± 0.99 . Sin embargo, para la cepa mutante BetR desecada y rehidratada por 20 minutos se obtuvo una BSR de 90.45 ± 2.68 a 37.20 ± 2.37 a partir de los 3 DPD hasta los 18 DPD. Además, la coloración de las colonias de bacterias recuperadas en medio MacConkey por 20 minutos fue de color rosa pálido a blanco indicando un bajo metabolismo de lactosa. La BSR aumentó considerablemente con 24 horas de restablecimiento en agua, registrándose una supervivencia de 92.60 ± 4.6 a los 3 DPD hasta 57.52 ± 1.7 a los 18 DPD. La coloración de las colonias recuperadas desde los 9, 12, 15 y 18 DPD fue rojo siendo indicativo de un metabolismo activo para procesar a la lactosa. Esta mejora sustancial en la supervivencia de la cepa mutante BetR sensible a la desecación puede ser explicada tomando como referencia a *Pseudomonas putida* KT2440, la cual, es una bacteria tipo PGPR con alto potencial agrobiotecnológico catalogada como muy sensible a la desecación ya que su BSR decae dramáticamente desde los 6 DPD (43.34 ± 7.66) llegando a cero a los 12, 15 y 18 DPD (Pazos-Rojas, *et al.* 2018), al igual que la cepa BetR. En el caso de *P. putida*, se ha demostrado que cuando es sometida a un proceso de

deseccación ambiental durante 18 días y rehidratada con exudados de raíz de maíz o con simplemente agua durante 24, 27, 30 y 48 horas se obtienen bacterias viables con membranas citoplasmáticas sanas. Por lo tanto, se ha llegado a la conclusión que *P. putida* responde al estrés por desecación entrando a un estado viable pero no cultivable (VBNC por sus siglas en inglés, “viable but nonculturable”) y que la rehidratación corta por 20 minutos no es suficiente para revertir este estado detectándose una supervivencia bacteriana nula. Sin embargo, cuando las bacterias son protegidas con disacáridos o rehidratadas por periodos largos se puede salir del estado VBNC y obtener conteos bacterianos altos (Pazos-Rojas *et al.*, 2019). Con respecto al estado VBNC se sabe que es un mecanismo de supervivencia a largo plazo que se inicia en respuesta a diferentes agentes estresantes como la radiación UV, limitación de nutrientes, alta salinidad, desecación y oxidación (Stokell y Steck, 2012). Las bacterias viables pero no cultivables no se pueden detectar fácilmente debido a que no crecen en medios del cultivo estándar, sin embargo, estas bacterias se encuentran en un estado de latencia con un metabolismo activo y cuando el agente estresante es retirado se puede inducir la reanimación de las bacterias (Oliver, 2010). Una de las estrategias más útiles y casi definitivas para demostrar que las bacterias han entrado a un estado VBNC ha sido precisamente el recrecimiento o la reanimación bacteriana, como sería el caso de la cepa mutante BetR que después de ser desecada y rehidratada por 24 horas se observó un incremento de 1.5 veces más en la BSR, indicando un recrecimiento o reactivación. Podría proponerse que la cepa BetR sensible a la desecación al ser portadora de una mutación que disminuye su capacidad para tolerar el secado al aire responde entrando a un posible estado VBNC. Sin embargo, es necesario hacer las demostraciones experimentales que incluyan ensayos de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD BacLight para microscopía (Molecular Probes Invitrogen Detection Technologies) y RT-qPCR de genes implicados en la condición VBNC para afirmar que la cepa BetR desecada entra en estado de latencia y que probablemente el gen *betR* mutado en esta cepa tiene relevancia tanto en la tolerancia a la desecación como probablemente en el estado VBNC.

Posteriormente, considerando los resultados de las condiciones experimentales de desecación ambiental y rehidratación se realizaron los estudios de los perfiles de expresión genética en la cepa T29A y BetR cultivadas en medio LB, desecadas por 12 días y rehidratadas por 20 minutos. Mediante el uso de un sistema heterólogo con microarreglos ADN de dos canales para *Escherichia coli* cepa K12 se analizó la expresión global de 4,608 genes, encontrándose para la cepa silvestre T29A tolerante a la desecación un total de 135 genes *Up* regulados y 133 genes *Down* regulados. Mientras que, para la cepa mutante BetR sensible a la desecación se encontró que 141 genes tienen regulación positiva y 60 genes están regulados negativamente. La clasificación por anotación de los genes *Up* regulados en la cepa T29A dio como resultado la formación de 15 agrupaciones, de las cuales, la agrupación de genes el grupo perteneciente a las proteínas de membrana, incluyendo los transportadores ABC y las proteínas de membrana externa, fue el grupo más relevante por tener la mayor proporción de genes y el mayor número de genes con el más alto nivel de expresión. De hecho, el aumento en la expresión de genes que codifican para proteínas que median transporte a nivel de membrana tiene gran relevancia para que las células puedan responder a los cambios osmóticos por medio de la incorporación de iones (K^+) y osmoprotectores (glicina/betaína). Igualmente, para el transporte de aminoácidos y moléculas orgánicas que sirvan para reordenar el metabolismo a una situación de estrés como es la desecación. De igual manera, las bombas de eflujo que participan en la salida de exopolisacáridos favorecerían la formación de biopelículas que protegen a la célula en el estado desecado. También, los grupos de genes que codifican para proteínas relacionadas con actividades del ADN como los reguladores transcripcionales y la reparación del ADN son de gran importancia, ya que el control de la expresión genética modularía la activación de genes necesarios para adaptarse a la pérdida del agua y silencia a los genes que no son necesarios para esta condición. Además, proteger y reparar al ADN es vital para poder sobrevivir y reestablecer las funciones celulares cuando las células son rehidratadas. Asimismo, los genes que codifican para proteínas con actividades enzimáticas relacionadas al metabolismo de azúcares y transferencia de energía (oxido/reducción,

unión/hidrólisis de nucleótidos, hierro/azufre) son necesarias para integrar y vincular todas las actividades celulares y respuestas adaptativas.

En otras bacterias resistentes a la desecación también se han realizado estudios de transcriptómica utilizando microarreglos para comprender de manera integral las respuestas transcripcionales a este agente estresante. Por ejemplo, para *Bradyrhizobium japonicum* (bacteria Gram-negativa) se analizó el transcriptoma para las condiciones de desecación a 27% HR durante 4, 24 y 72 horas comparando con un control a 100% de HR, encontrándose que existe una expresión diferencial de 15 a 20% de los 8,480 marcos de lectura abiertos. Básicamente, los genes *Up* y *Down* regulados en estas bacterias desecadas fueron agrupados en 16 categorías funcionales, de las cuales, la categoría de genes que codifican para proteínas hipotéticas presentó el mayor número de genes inducidos y reprimidos. Posteriormente, los grupos con mayor abundancia corresponden a las categorías de genes que codifica para reguladores transcripcionales, transporte, catabolismo y transferencia de energía (Cytryn *et al.*, 2007). Por otra parte, un estudio de transcriptómica sobre el actinomiceto *Rhodococcus jostii* RHA1 (bacteria Gram-positiva) que posee capacidades favorables para sobrevivir a sequías prolongadas ha revelado que la desecación por 2 horas a 20% de HR induce en una respuesta transcripcional diferencial de aproximadamente 8 veces más que la expresión genética del control a 100% de HR (819 *versus* 106 genes, respectivamente). Los genes que se expresaron diferencialmente solo durante el tratamiento de desecación estuvieron asociados a procesos celulares como la división celular, la recombinación y la reparación del ADN, el metabolismo de lípidos y la modificación de la envuelta celular (LeBlanc *et al.*, 2008). Así mismo, se han realizado análisis del transcriptoma de la cianobacteria fijadora de N₂ y tolerante a la desecación *Anabaena* sp. PCC₇₁₂₀ sometida a desecación temprana (10-30 minutos), media (1 a 3 horas) o tardía (6 a 22 horas). Estos estudios evidenciaron que existe una expresión diferencial de genes al alza y a la baja dependiendo de las etapas temprana, media o tardía de desecación. De manera general, es ese estudio demostraron que los genes relacionados al metabolismo de azúcares para la

síntesis de osmoprotectores, estrés salino y proteínas de membrana se expresan positivamente en las etapas temprana y media. Además, los genes para la ARN polimerasa y proteínas ribosómicas se regulan negativamente en la fase inicial y media.

En todos estos trabajos ha quedado evidenciado que para la tolerancia a la desecación durante las primeras 48 horas del secado al aire se requiere de un conjunto de respuestas transcripcionales relacionadas a la expresión de genes involucrados en la regulación transcripcional, síntesis de osmoprotectores, transporte a nivel de membrana, recombinación y reparación del ADN, metabolismo y transformación de energía. De la igual manera, en el presente trabajo encontramos la misma relevancia en el incremento en la expresión de genes que codifican para transportadores y proteínas de membrana, reguladores transcripcionales, enzimas para el metabolismo y transformación de energía, proteínas que reparan y recombinan el ADN. Sin embargo, cabe resaltar que nuestro análisis de expresión global se realizó a los 12 días posteriores a la desecación ambiental obteniendo un transcriptoma para una condición de desecación a largo plazo en la cepa T29A.

Además, a diferencia de los anteriores estudios que compararon los perfiles de expresión genética de células desecadas a 20-27% HR contra un control mantenido a 100% HR, nosotros también realizamos el análisis de expresión genética para la cepa mutante BetR sensible a la desecación obteniéndose que para genes *Up* regulados se formaron 12 grupos. Al igual que la cepa T29A, en la cepa BetR la categoría de genes que codifica para proteínas de membrana fue la más importante seguida de las categorías de genes como reguladores transcripcionales, metabolismo de azúcares y unión a nucleótidos. Estos resultados confirman la relevancia de la activación de genes que codifican para proteínas transportadoras, reguladores transcripcionales y enzimas como respuesta a la desecación. No obstante, las respuestas transcripcionales de la cepa mutante BetR también incluyeron la activación de un grupo de genes clasificados en la categoría de recombinación del DNA y a la represión de genes clasificados en grupos de

transcripción/unión al ADN y ribosoma/traducción/unión al ARN. De hecho, comparando los perfiles de expresión genética entre la cepa T29A tolerante y la cepa mutante BetR sensible a la desecación encontramos que un 5.38% (248 genes *Up* y *Down* regulados) y 4.36% (201 genes *Up* y *Down* regulados) de genes, respectivamente, cambian su expresión ante el estado desecado durante 12 días. Así mismo, encontramos que entre el 20-24% de genes incrementaron su expresión y que entre un 20-10% de genes disminuyeron su expresión en ambas cepas. Estos resultados indican que la mutación que inhabilita el gen *betR* en la cepa sensible afecta el transcriptoma global ante un estímulo estresante como es la desecación al aire, ya que un menor porcentaje de genes cambiaron su expresión con respecto a la cepa tolerante al secado. Además, cada cepa respondió de manera diferencial ya que aproximadamente el 80% de genes *Up* y *Down* regulados es diferente para cada cepa, obteniéndose un perfil de expresión genética para la tolerancia a la desecación y la pérdida de esta por la mutación en el gen *betR*.

Por otra parte, el análisis de los perfiles de expresión genética ha traído como ventaja determinar la relevancia del aumento o disminución de la expresión de genes específicos para tolerar la desecación. De hecho, las evidencias experimentales han dejado claramente demostrado que se requiere de la activación y el incremento en la expresión genética de un conjunto de genes involucrados en proteger a las células del estrés osmótico producido por la pérdida de agua mediante la biosíntesis o incorporación de osmoprotectores (Santos y Da Costa, 2002), estabilización de membranas biológicas y reemplazo de moléculas de agua por solutos compatibles como trehalosa o diferentes disacáridos (Crowe, 2007) que forman citoplasmas vítreos (Green y Angell, 1988), modificación de proteínas y lípidos de membrana (Crowe y Crowe, 1992; Leslie *et al.*, 1995), expresión de acuaporinas y proteínas LEA (Tanghe *et al.*, 2006; Hand *et al.*, 2011), protección del ADN y eliminación de especies reactivas de oxígeno (Humann *et al.*, 2009), síntesis de exopolisacáridos que forman cápsulas protectoras (Vanderlinde *et al.*, 2010), producción de pigmentos fotoreactivos, osmoprotectores, antioxidantes y

destoxificantes (Baliarda *et al.*, 2003, Matallana-Surget *et al.*, 2012), modificación de la morfología colonial y control de la transcripción de genes (Potts, 1994).

Con respecto a la expresión específica de genes en la cepa T29A desecada durante 12 días, encontramos genes *Up* regulados que codifican para proteínas relacionadas con la osmoprotección temprana y con la incorporación/metabolización de solutos compatibles (genes *yggT*, *ybdG*, *proW* y *betA*). Al respecto, el gen *yggT* es un homólogo del gen *fkuB* y codifica para una proteína de membrana que participa en la incorporación de K⁺ en condiciones de estrés hiperosmótico en *E. coli* (Ito *et al.*, 2009). El gen *ybdG* codifica para un canal mecanosensible que pertenece a un sistema de detección mecánica que transmite señales para modular la respuesta adaptativa a la hiperosmolaridad en *E. coli* (Amemiya *et al.*, 2019) El gen *proW* codifica para una subunidad del transportador ABC de alta afinidad para el osmoprotector glicina betaína y el gen *betA* codifica para una deshidrogenasa de colina que oxida a su sustrato para obtener glicina betaína que confiere alta osmoprotección en *E. coli* (Gul y Poolman, 2013; Landfald y Strøm, 1986). Además, se ha encontrado que la glicina betaína y la colina pueden ser usados como fuente de nitrógeno o como osmoprotectores ante un estrés salino en *Sinorhizobium meliloti* (Pocard *et al.*, 1997) y *P. putida* (Galvão *et al.*, 2006). Como hemos mencionado, la tolerancia a la desecación requiere de diversas estrategias que protejan a las células de la letal pérdida de agua que induce una elevada presión osmótica y precisamente una de estas estrategias es la osmoprotección. Se ha propuesto que la respuesta adaptativa a la presión osmótica se realiza en dos etapas, la primera es la absorción de iones K⁺ con un incremento concomitante de la síntesis de glutamato para equilibrar cargas. La segunda fase de adaptación es el reemplazo de K⁺-glutamato con solutos compatibles no iónicos que se usan para dar contención perdurable a la fuerte presión osmótica generada por la desecación. Al mismo tiempo, se propone que la acumulación de K⁺-glutamato pueda tener una función como una vía de segundos mensajeros para activar la síntesis de solutos compatibles como la trehalosa, colina, glicina betaína y ectoína (Du *et al.*, 2018; Lebre *et al.*, 2017; Strøm y Kaasen, 1993).

Asimismo, se ha mencionado que el secreto de la tolerancia a la desecación es la incorporación o biosíntesis de disacáridos como la trehalosa que proporciona un balance osmótico y da estabilización a las membranas biológicas a largo plazo (Potts, 2001; Cytrin *et al.*, 2007). En nuestro caso, no detectamos aumento en la expresión de los clásicos genes implicados en el metabolismo de trehalosa (*otsA*, *otsB* y *treS*), lo cual, probablemente se debió a que nuestro análisis de expresión genética fue realizado a los 12 días de la desecación a diferencia de la mayoría de los estudios que determinan la expresión de genes durante las primeras 72 horas de iniciar la desecación. Otra explicación, podría ser que *K. variicola* T29A no use la trehalosa como soluto compatible para protegerse de la desecación, si no que su soluto específico sea la glicina betaína. Referente al uso determinado de solutos compatibles ya se ha reportado que bacterias como *Rhodococcus jostii* RHA1 el principal soluto compatible es la ectoína, que funciona como un osmoprotector cuando el agua es eliminada por la desecación. Genes como *ectA* y *ectC* que codifican para enzimas de la ruta biosintética de la ectoína incrementan su expresión genética a las 12 horas de secado en esta bacteria Gram-positiva (LeBlanc *et al.*, 2008).

En el caso de protección del estrés oxidativo generado en la desecación, la cepa T29A respondió aumentando la expresión de genes específicos como *gsiD* (b0832) y *sodA*. El gen *gsiD* también conocido como *yliD* en *E. coli*, codifica para una proteína de membrana interna que forma parte del importador de glutatión con un casete de unión al ATP (Suzuki *et al.*, 2005). El glutatión (GSH, del inglés *γ -glutamylcysteinylglycine*) ha sido considerado como el antioxidante natural más potente y el mejor instrumento de defensa celular para reducir las especies de reactivas de oxígeno y los peróxidos (Smirnova y Oktyabrsky, 2005). Sin embargo, la relevancia del glutatión como agente antioxidante para proteger de la desecación en bacterias ha sido poco explorado. De hecho, solamente se tiene referencia que la adición de glutatión induce un aumento de la tolerancia a la desecación de *Staphylococcus aureus* (Chaibenjawong y Foster, 2011). Por lo dicho anteriormente, el aumento en la expresión del gen *gsiD* en la cepa tolerante a la desecación T29A

podría ser considerado para explorar la participación del glutatión en la biología anhidronionte de bacterias, ya que también se detectó un aumento en la expresión de los genes *grxC* (glutaredoxina 3) y *gor* (glutatión reductasa) que codifican para enzimas relevantes del metabolismo del glutatión. Por su parte, el gen *sodA* codifica para una enzima antioxidante, la superóxido dismutasa (Mn) que convierte radicales superóxido en oxígeno molecular para proteger del estrés oxidativo (Bruno-Bárcena *et al.*, 2010). Como se mencionó en los antecedentes, el estrés por desecación trae como consecuencia la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan macromoléculas vitales como el ADN, proteínas y lípidos (Krenner y Birtić, 2005). Por lo tanto, la tolerancia a la desecación implica la activación transcripcional de genes que codifican para enzimas que eliminen las ROS. Por ejemplo, consistente con nuestro estudio en los análisis de respuestas transcripcionales de *B. japonicum* sometidas a desecación demostraron un incremento en la expresión de genes como *sodF*, *chrC* y *prxS*-like que codifican para superóxido dismutasas y proteínas antioxidantes. A diferencia, en organismos altamente tolerantes a la desecación como *Anabaena* sp. PCC7120 (Kato *et al.*, 2004), *R. jostii* RHA1 (LeBlanc *et al.*, 2008) y *S. aureus* (Chaibenjawong y Foster, 2011) la neutralización de especies reactivas de oxígeno se realiza por la activación de genes que codifican para catalasas (genes *alr3090*, *katG*, y *katA*, respectivamente).

En cuanto a la protección y reparación del DNA, la cepa T29A desecada durante 12 días mostró una regulación positiva de los genes *dps* y *mfd*. Con respecto al gen *dps* se conoce que codifica para la proteína Dps, la cual, se expresa en condiciones de estrés nutricional y oxidativo para proteger al ADN mediante una reacción de ferroxidación para reducir los radicales hidroxilos (Bellapadrona *et al.*, 2010). Además, la proteína Dps organiza el cromosoma en un complejo de nucleoproteínas estable y altamente ordenado llamado biocristal que protege al ADN no solo del estrés oxidativo y nutricional, sino también de la radiación ultravioleta y gamma, de la toxicidad del hierro y el cobre, del estrés térmico y el choque ácido y básico (Nair y Finkel, 20014). Previamente, el aumento en la expresión del gen *dps* ya había sido determinada en los análisis transcriptómicos del actinomiceto *R. jostii* RHA1

sometido al proceso de secado al aire. Estos estudios identificaron como principal respuesta transcripcional el aumento significativo de la expresión de los genes *dps1* y *2* para sobrevivir al estrés hídrico, indicando que la activación del gen *dps* posiblemente sea un mecanismo crítico en protección del ADN para asegurar la supervivencia a la desecación de *R. jostii* (LeBlanc *et al.*, 2008). Por otro lado, el gen *mfd* codifica para el factor de acoplamiento de reparación a la transcripción mediante el reclutamiento del sistema de reparación por escisión de nucleótidos. Se ha demostrado que durante el crecimiento bacteriano los daños en el ADN se reparan en genes transcripcionalmente activos mediante el proceso denominado reparación acoplada a la transcripción. En este proceso, la proteína Mfd responde a la ARN polimerasa estancada por lesiones en el ADN reclutando a la proteína UvrA del sistema de reparación de nucleótidos (Kanawalt y Spivak, 2008). La relevancia de la expresión del gen *mfd* en la tolerancia a la desecación solamente ha sido determinada en un análisis de secuencias genómicas de cuatro bacterias resistentes a las radiaciones ionizantes y a la desecación (*Deinococcus geothermalis*, *Deinococcus radiodurans*, *Kineococcus radiotolerans* y *Rubrobacter xylanophilus*). En este análisis bioinformático se dedujeron conjuntos de genes ortólogos que potencialmente evolucionaron debido a la selección darwiniana positiva para la tolerancia a la radiación y desecación, encontrándose que todos los genes de reparación del ADN tienen esta selección positiva. Precisamente, en ese trabajo se encontró que el gen *mfd* tiene valores altos de selección darwiniana positiva indicando su potencial relevancia en la tolerancia a la radiación y desecación (Sghaier *et al.*, 2008). Cabe destacar, que considerando los antecedentes es probable que *dps* participe en la protección del ADN durante el proceso de desecación a través de la neutralización de agentes oxidantes y que *mfd* participe en la reparación del ADN durante el proceso de recuperación de la desecación. Además, la protección y reparación del ADN requiere de las actividades de helicasa. Al respecto, la cepa T29A desecada mostró una regulación al alza de los genes *recQ* y *recG*, los cuales codifican para helicasas involucradas en la iniciación de la señalización SOS (despejando bifurcaciones de replicación

bloqueadas) y en la reparación de roturas de ADN doble cadena, respectivamente (Hishida *et al.*, 2004; Whitby *et al.*, 1994).

La construcción de biopelículas que forman recubiertas protectoras es también considerada como una notable estrategia de tolerancia a la desecación (Vanderlinde *et al.*, 2010). El análisis de los perfiles de expresión genética de la cepa T29A desecada durante 12 días mostró *Up* regulación en los genes *ycdT*, *flu*, *yehC*, *yadH*, *rhaR*, *rhaS*, *araC*, *ydeA*, *wcaD*, *wcaB*, *yceL*, *yidY* y *ygiD*. Particularmente, el gen *ycdT* fue el segundo gen regulado positivamente con mayor Z-Score en la cepa T29A, indicando que juega un papel muy importante en la tolerancia a la desecación de esta cepa silvestre. El gen *ycdT* codifica para una diguanilato ciclasa predicha que transforma el GTP en 3',5'-diguanilato cíclico (c-di-GMP), el cual, al aumentar su concentración modula de manera negativa la motilidad y regula positivamente la formación de biopelículas en *E. coli* y *Salmonella enterica* (Jonas *et al.*, 2008). Además, el aumento en la concentración de c-di-GMP está relacionado con la activación de genes involucrados en la biosíntesis de microfibrillas de celulosa que forman parte de la matriz extracelular de las biopelículas que sirven para unir a las células de una colonia en condiciones de estrés nutricional y baja osmolaridad (Branda *et al.*, 2005). Por su parte, el gen *flu* codifica para una proteína de membrana externa de la familia de autotransportadores (Diderichsen, 1980). En *E. coli* esta proteína es conocida como el antígeno 43 (Ag43) y funciona como una adhesina corta que contribuye a la maduración de biopelículas (Danese *et al.*, 2000). Asimismo, se ha demostrado que las biopelículas de *K. pneumoniae* están constituidas por fimbrias tipo 1 y 3, ADN y exopolisacáridos que contienen manosa, ramnosa, galactosamina, arabinosa y ácido colánico (Bales, *et al.*, 2013; Rättö *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2019). Al respecto, dentro de los genes *Up* regulados de la cepa T29A está el gen *yehC* que codifica para una presunta chaperona frimbrial (Korea *et al.*, 2010) y el gen *yadH* que codifica para una supuesta proteína de membrana con funciones de transportador de eflujo de la superfamilia ABC (Fujita *et al.*, 1994). La expresión positiva del gen *yehC* en la cepa T29A estaría proporcionando evidencia para la participación de

fimbrias en la probable formación de biopelícula en esta cepa tolerante a la desecación. Además, se ha encontrado que en un aislado de *K. pneumoniae* la mutación por inserción del miniTn5 en el gen *yadH* elimina la expresión de las fimbrias tipo 3 presente en las biopelículas de estas bacterias (Langstraat *et al.*, 2001). Con respecto a los azúcares de los exopolisacáridos de las biopelículas, el perfil de expresión genética de la cepa T29A mostraron aumento en la expresión de los genes *rhaR* y *rhaS* que codifican para activadores transcripcionales de la familia AraC/XylS del regulón catabólico L-ramnosa (Egnan y Schleif, 1994). El gen *araC* codifica para el regulador transcripcional dual de los operones *araBAD* y *araFGH* para el metabolismo de arabinosa (Fujita *et al.*, 1994). Conjuntamente, el gen *wcaD* que codifica para una polimerasa de ácido colánico y el gen *wcaB* que codifica para una acil transferasa putativa que participa en la biosíntesis del mismo ácido (Stevenson *et al.*, 1996), aumentaron su expresión en la cepa T29A. De hecho, el ácido colánico junto con la celulosa y la poly- β -1,6-*N*-acetilglucosamina forman una matriz rica en polisacáridos necesaria para la maduración de las biopelículas (Limoli *et al.*, 2015). También, se ha sugerido que las bombas de eflujo de múltiples fármacos y toxinas podrían participar en la salida de exopolisacáridos y moléculas de *quorum sensing* que facilitan la formación de biopelículas (Alav *et al.*, 2018). En la cepa T29A la *Up* regulación de los genes *yceL* (*mdtH*) y *yidY* (*mdtL*) que codifican para bombas de eflujo de la superfamilia de facilitadores principales (MFS) sugieren su participación en la probable formación de biopelículas. Considerando, que en la cepa T29A varios genes *Up* regulados posiblemente estén participando en la construcción de biopelícula se podría proponer que este mecanismo de protección tiene un papel fundamental para la resistencia al estado desecado para esta cepa de *Klebsiella variicola*.

Los estudios de transcriptómica de bacterias sometidas a desecación han revelado que la regulación positiva de genes que codifican para reguladores transcripcionales es muy relevante para la regulación de funciones requeridas para responder a las condiciones de estrés hídrico. En el caso de *B. japonicum* se detectó un aumento significativo en la regulación de la expresión del gen que codifica para el factor σ^{54}

(*rpoN2*) indicándose su participación en la expresión de genes implicados en el metabolismo del nitrógeno (Cytryn *et al.*, 2007). Aunque en la cepa T29A no se detectó el aumento en la expresión de genes *rpoN*, si encontró un aumento en la expresión del gen *narL* que codifica para un regulador de respuesta para genes involucrados en la respiración de nitrato durante la anaerobiosis (Stewart, 1994). Sin embargo, en la cepa T29A desecada por 12 días el gen *rpoE* que codifica para el factor σ^E fue regulado positivamente. Se ha considerado que el factor σ^E es esencial para la viabilidad celular ya que se requiere de su actividad para mantener la integridad de la envoltura celular y combatir los daños por estrés (Hayden y Ades, *et al.*, 2008). Además, en la cepa T29A se detectó un aumento en la expresión del gen *baeR* que codifica para un regulador de la vía BaeSR que controla el operón *mdtABCD* (bombas de eflujo de multidrogas) implicado una de las seis respuestas a estrés que dañan la envoltura celular en *E. coli* (Leblanc *et al.*, 2011). Al respecto, se ha establecido que el mantenimiento de las membranas citoplasmáticas es vital para la tolerancia a la desecación (Romantsov *et al.*, 2009). Por otro lado, en la cepa T29A también se detectó el aumento en la expresión del gen *ydaR*, que en *E. coli* es conocido como el gen *racR* y codifica para el represor transcripcional RacR. De Hecho, se ha considerado al gen *racR* como esencial para *E. coli*, ya que silencia la expresión de los genes *ydaS-T* que codifican por toxinas que inducen la muerte celular (Krishnamurthi *et al.*, 2017). Debido a que el gen *ydaR* tuvo un Z-Score alto sería adecuado indagar más sobre su participación en la tolerancia a la desecación y en la relevancia de reprimir las toxinas YdaS-T, ya que se ha demostrado que el represor transcripcional RacR no tienen muchos genes blancos y es altamente específico para este sistema (Krishnamurthi *et al.*, 2017). Otro gen que incrementó su expresión en la cepa T29A fue el gen *nusA* que codifica para el factor NusA esencial para la formación de complejos antiterminación de la transcripción del ARNr y para la estimulación de las pausas clase I de la transcripción donde una horquilla de ARN naciente se localiza en el canal de salida de la RNAP (Guo *et al.*, 2018). Asimismo, se observó el incremento en la expresión del gen *cspG* que codifica para una proteína de choque frío con funciones de chaperona de ARN que previenen la formación de estructuras secundarias de ARNm para una traducción

eficiente a bajas temperaturas (Jones *et al.*, 1987). La expresión del gen *cspG* estaría aportando evidencia sobre la relevancia del mantenimiento de la traducción, si bien la chaperona CspG se induce con el frío podría ser requerida para tolerar otro tipo de estrés como es la desecación. Además, el aumento en la expresión de los genes *nusA* y *cspG* serían indicadores de la importancia de los mecanismos de transcripción y traducción durante la desecación y tal vez, en la recuperación por rehidratación.

Con respecto al perfil de expresión genética específica de la cepa mutante BetR que ha perdido el fenotipo de tolerancia a la desecación por la inserción del mini Tn5 en el gen *betR*, encontramos que se expresan ciertos genes que relacionamos con la tolerancia a la desecación en la cepa T29A, como la producción de solutos compatibles (*proW* y *betA*), protección del estrés oxidativo (b0832 (*gsiD*), *sodA* y *gor*) y producción de biopelícula (*ycdT*, *flu*, *rhaR*, *araC* y *ydeA*). Además, se detectó el aumento en la expresión de genes que sólo se expresan en la cepa BetR y que también podrían estar relacionados con tolerancia a la desecación, como por ejemplo el gen *soxS* (activador transcripcional de la respuesta de regulón superóxido), el gen b0829 (subunidad de un transportador de glutatión GsiA), el gen *treA* (trehalasa periplasmática), el gen *ihfB* (proteína de unión al ADN implicada en la reorganización del nucleóide ante cambios ambientales severos) el gen *yahA* (fosfodiesterasa específica de c-di-GMP) el gen *lpxA* (UDP-N-acetilglucosamina aciltransferasa que cataliza la primera reacción de biosíntesis del lípido A), el gen *kdtA* (supuesta KDO transferasa implicada en la síntesis de lípido A), el gen *yjbG* (proteína involucrada en la biosíntesis de cápsulas y aumento de exopolisacárido distinto al ácido colánico inducido por estrés osmótico) y el gen *yhiV* (transportador de flujo de salida de multidrogas). Si bien la cepa BetR tiene todo el conjunto de genes para contender a la desecación, la inserción del transposón mini Tn5 en el gen *betR* conduce a un cambio en las respuestas transcripcionales para tolerar el estrés hídrico, aunque el incremento en la expresión de estos genes probablemente implicados para tolerar la desecación no es suficiente. Debido a que en la cepa BetR no se detectó el aumento en la expresión de los genes *yggT*, *ybdG*, *dps*, *mfd*, *rpoE*,

cspG podríamos atribuir su sensibilidad a la desecación a la pérdida de respuestas transcripcionales relacionadas con la protección temprana al estrés osmótico, protección al ADN, transcripción y traducción en respuesta a estímulos estresantes. Aunado a que en la cepa BetR disminuyó de manera específica la expresión de reguladores transcripcionales que son responsables de la inducción de respuestas a estrés osmótico (gen *nhaR*) y de genes que participan en la reparación del ADN (*uvrB* y *ytfA*). También, al descenso en la expresión de genes involucrados en la traducción (gen *rhsA*), componentes estructurales de los ribosomas (gen *rpsT*) y reciclaje de ribosomas estancados por ARNm dañado (gen *smpB*). Además, debido a que en la cepa BetR se mostró un aumento en la expresión de genes que codifican para transposasas (genes b1432, *yhhl*, *yafM*), integrasa (gen b1345) y polimerasa tendiente al error (gen *umuC*) se podría sugerir que en la cepa BetR se inducen respuestas transcripcionales para reordenar el material genético o replicar el ADN con errores como medida para poder contender a la desecación ambiental. Sin embargo, es necesario corroborar el aumento o la represión transcripcional tanto en la cepa T29A y BetR mediante RT-qPCR de los genes que probablemente tengan funciones fundamentales en la tolerancia a la desecación o en la pérdida de esta. Además, es preciso ahondar más en el conocimiento sobre el contexto genético y sobre los aspectos generales del gen *betR* ya que de acuerdo con el análisis bioinformático este gen codificaría para una proteína con dominio BetR perteneciente a la familia de reguladores transcripcionales de elementos de respuesta xenobiótica (HTH-XRE), de la cual aún no se conocen sus características particulares y sus actividades como regulador de respuesta.

Por todo lo mencionado anteriormente, el presente trabajo aporta por primera vez evidencia experimental sobre las respuestas transcripcionales globales y específicas de la enterobacteria *Klebsiella variicola* cepa T29A tolerante a la desecación y su mutante BetR sensible a la desecación por la inserción del mini transposón Tn5 en el gen *betR*. Contribuyendo al conocimiento sobre la tolerancia a la desecación y de la relevancia de las respuestas al estrés osmótico y oxidativo,

reparación del ADN y la formación de biopelículas. Así como, el potencial que tendrían en el uso de recursos genéticos para aplicaciones biotecnológicas y agroindustriales.

10. Conclusiones

1. La tolerancia a la desecación de la cepa T29A no es afectada por las condiciones de precultivo y cultivo, por la recuperación en tres diferentes medios, ni por el tiempo de rehidratación.
2. La sensibilidad a la desecación de la cepa BetR se manifiesta desde el día seis de desecación ambiental y la recuperación es afectada por el medio de precultivo y cultivo. Además, la rehidratación por 24 horas mejora sustancialmente la recuperación en medio MacConkey.
3. En ambas cepas T29A y BetR la clasificación por anotación de los genes *Up* regulados forma agrupaciones en las categorías de proteínas de membrana, metabolismo, unión a nucleótidos, proteínas hipotéticas, reguladores transcripcionales, reparación del ADN y transferasas de piridoxal fosfato. Asimismo, las agrupaciones de los genes *Down* regulados para las dos cepas comprenden las categorías de proteínas de membrana, proteínas hipotéticas, reguladores transcripcionales y metabolismo.
4. Cada cepa presentó de manera diferencial agrupaciones por anotación para los genes *Up* y *Down* regulados. En la cepa T29A específicamente para genes *Up* regulados se formaron agrupaciones por anotación en las categorías de proteasas y proteínas con hierro/azufre. Mientras que en la cepa BetR las categorías específicas de genes *Up* regulados fueron para el sistema de fosfotransferencia y recombinación del ADN. Con respecto a los genes *Down* regulados, las agrupaciones particulares de la cepa T29A fueron las categorías de proteínas con hierro/azufre, unión a lípidos, unión/hidrólisis del ATP, unión al magnesio y sistemas de fosfotransferencia. En cambio, en la cepa BetR los genes *Down* regulados formaron agrupaciones específicas en las categorías de transcripción/unión al ADN y ribosoma/traducción/unión al ARN.
5. Las repuestas transcripcionales específicas de genes relacionados con la tolerancia a la desecación en la cepa T29A implican mecanismos de

osmoprotección, salvaguarda del estrés oxidativo, protección y reparación del ADN y síntesis de biopelícula.

6. La sensibilidad a la desecación de la cepa BetR se manifiesta en sus respuestas transcripcionales de menor o nula intensidad de genes implicados en osmoprotección, salvaguarda del estrés oxidativo, protección y reparación del ADN, síntesis de biopelícula, síntesis de proteínas y formación/reciclaje de ribosomas.
7. El gen *betR* que codifica para regulador transcripcional de la familia HRH-XRE tiene un papel fundamental en la expresión del fenotipo de tolerancia en la desecación y al estar interrumpido en la cepa sensible a desecación puede afectar la regulación de diversos genes de manera global.

Perspectivas

Los análisis de microarreglos de ADN son considerados como excelentes plataformas para evaluar respuestas transcripcionales a diferentes estímulos mediante el análisis simultáneo de cambios en la expresión de miles de genes. Sin embargo, el aumento o disminución en la expresión genética de genes específicos determinada por los microarreglos, se puede correlacionar de manera cuantitativa mediante RT-qPCR. Por lo tanto, se propone analizar de manera cuantitativa los genes *Up* regulados que podrían tener una función relevante en la tolerancia/sensibilidad a la desecación en las cepas T29A y BetR. Los genes sugeridos son *betR* (control de expresión para ambas cepas), *yggT* (transportador de K⁺), b0832 (transportador de glutatión) *proW* (permeasa de glicina/betaína), *sodA* (superóxido dismutasa), *dps* (proteína Dps que protege al ADN en condición de estrés), *mfd* (proteína involucrada en la reparación del ADN), *ycdT* (diguanylato ciclasa), *umuC* (subunidad de la ADN polimerasa propensa a error), b1432 (transposasa), *flu* (autotransportador para la síntesis de biopelículas), *yceL* (transportador multidrogas) (*rhaR* y *rhaS* (reguladores del regulón de L-ramnosa), *araC* (regulador dual del operón de arabinosa) y *rpoE* (factor sigma alternativo). Para los genes *Down* regulados se sugiere examinar a los genes *uvrB* (Exinucleasa de reparación por escisión de nucleótidos), *nhaR* (activador transcripcional responsable de la inducción osmótica de *osmC*), *smpB* reciclaje de los ribosomas atrapados en el ARNm dañado en condiciones de estrés, *leuO* (regulador transcripcional) y *ftsK* (translocasa de ADN en el anillo septal que clasifica los cromosomas hijos).

Derivado del estudio de microarreglos donde se encontró que las cepas T29A y BetR tienen perfiles de expresión genética diferente también se propone que se realicen análisis bioinformáticos de las listas de genes *Up* y *Down* regulados para encontrar anotaciones de vías metabólicas, procesos biológicos, interacciones proteicas y funciones moleculares que proporcionen información sobre las

respuestas adaptativas que *Klebsiella variicola* T29A tiene para sobrevivir al estado desecado. De igual manera, estos estudios aportarían información para generar un modelo teórico del funcionamiento del gen *betR* y del mecanismo de acción de su producto proteico como un regulador de respuesta vital para tolerar al estrés por desecación. Aunado a estos estudios, también sería de gran relevancia efectuar experimentos bioquímicos para medir las concentraciones de antioxidantes (glutación) y osmoprotectores (glicina/betaína), análisis moleculares y genéticos de sobreexpresión o mutaciones puntuales del gen *betR* para completar su caracterización, observaciones a nivel celular para comparar los cambios morfológicos de la cepa silvestre tolerante a la desecación y la cepa mutante sensible a la misma.

11. Literatura citada

- Alav, I., Sutton, J. M., Rahman, K. M. (2018). Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1;73(8): 2003-2020. doi: 10.1093/jac/dk y042.
- Allen, M. E. (2005). MacConkey agar plates protocols. American Society for Microbiology. pp. 1-4
- Alpert, P. (2005). The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. *Integrative and Comparative Biology*, 45: 685-695. <https://doi.org/10.1093/icb/45.5.685>
- Alpert, P. (2006). Constraints of tolerance: why are dedication-tolerance organisms or rare? *J Exp Biol*, 209: 1575 - 1584; doi: 10.1242 / jeb.02179
- Alpert, P., and Oliver, M. J. (2002). Drying without dying. In *Desiccation and Survival in Plants: Drying Without Dying* (ed. M. Black and H. W. Prichard), pp. 3 -43. Wallingford, UK: CAB International.
- Amemiya, S., Toyoda, H., Kimura, M., Saito, H., Kobayashi, H., Ihara, K., Kamagata, K., Kawabata, R., Kato, S., Nakashimada, Y., Furuta, T., Hamamoto, S., & Uozumi, N. (2019). The mechanosensitive channel YbdG from *Escherichia coli* has a role in adaptation to osmotic up-shock. *Journal of Biological Chemistry*, 294(33): 12281–12292. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.007340>

- Atieno, M., Wilson, N., Casteriano, A., Crossett, B., Lesueur, D., Deaker, R. (2018). Aqueous peat extract exposes rhizobia to sub-lethal stress which may prime cells for improved desiccation tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102: 7521–7539. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9086-2>
- Bales, P. M., Renke, E. M., May, S. L., Shen, Y., Nelson, D. C. (2013). Purification and Characterization of biofilm-associated EPS exopolysaccharides from ESKAPE organisms and other pathogens. *PloS one*, 8(6): e67950. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067950>
- Ball, P. (2017). Water in cell and molecular biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(51): 13327-13335. doi: 10.1073/pnas.1703781114
- Barrios-Camacho, H., Aguilar-Vera, A., Beltrán-Rojel, M., Aguilar-Vera, E., Durán-Bedolla, J., Rodríguez-Medina, N., Lozano-Aguirre, L., Pérez-Carrascal, O. M., Rojas, J., Graza-Ramos, U. (2019). Molecular epidemiology of *Klebsiella variicola* obtained from different sources. *Scientific Reports*, 9:10610. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46998-9>
- Bartels, D. (2005). Desiccation tolerance studied in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Integrative and Comparative Biology*, 45(5): 696-701. <https://doi.org/10.1093/icb/45.5.696>
- Billi, D., and Potts, M. (200). Life without water: responses of prokaryotes to desiccation, in: K.B. Storey, J.M. Storey (Eds.), *Environmental stressors and gene responses*, Elsevier, Amsterdam, 2000, pp. 181– 192.
- Billi, D., and Potts, M. (2002). Life and death of dried prokaryotes. *Research in Microbiology*, 153(1): 7-12. doi: 10.1016/s0923-2508(01)01279-7
- Branda, S. S., Vik, S., Friedman, L., Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13(1): 20-26. doi: 10.1016/j.tim.2004.11.006
- Bruno-Bárcena, J. M., Azcárate-Peril, M. A., Hassan, H. M. (2010). Role of antioxidant enzymes in bacterial resistance to organic acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(9): 2747–2753. <https://doi.org/10.1128/AEM.02718-09>
- Calahan, D., Dunham, M., DeSevo, C., Hoshland, D. E. (2011). Genetic analyses of desiccation tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 189(2): 507-519. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.130369>
- Chakrabortee, S., Boschetti, C. Walton, L. J., Sarkar, S., Rubinsztein, D. C., Tunnacliffe, A. (2007). Hydrophilic protein associated with desiccation tolerance exhibits broad protein stabilization function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 104(46): 18073–18078. doi: 10.1073/pnas.0706964104

- Chang, W. S., M. van de Mortel, M., Nielsen, J., Nino de Guzman, G., Li, X., Halverson, L. J. (2007). Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. *Journal of Bacteriology*, 189(22): 8290–8299. doi: 10.1128/JB.00727-07
- Clegg, J. S. (1973). Do dried cryptobioties have a metabolism? In *Anhydrobiosis* (ed. J. H. Crowe and J. S. Clegg), pp. 141-146. Stroudsburg, PA: Dowden, Hutchinson and Ross.
- Corral-Lugo, A. (2010). Determinación de genes de resistencia a desecación, por mutagénesis al azar, en *Klebsiella variicola* T29A2 del tipo PGPR. Tesis de maestría, Posgrado de Ciencias Microbiológicas. Instituto de Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Costa, M. C. D., Farrant, J. M., Oliver, M. J., Ligterink, W., Buitink, J., Hilhorst, H. M. W. (2016). Key genes involved in desiccation tolerance and dormancy across life forms. *Plant Science*, 251: 162-168. doi:10.1016/j.plantsci.2016.02.001.
- Crowe, J. H. (1971). Anhydrobiosis: an unsolved problem. *American Naturalist*, 105(946): 563–573. <http://www.jstor.org/stable/2459752>
- Crowe, J. H. (2007) Trehalose as a “Chemical Chaperone”. In: Csermely, P., Vigh, L. (eds) *Molecular Aspects of the Stress Response: Chaperones, Membranes and Networks. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 594. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-39975-1_13
- Crowe, J. H., and Crowe, L. M. (1992). Membrane integrity in anhydrobiotic organisms: toward a mechanism for stabilizing dry cells, p. 87-103. In G. N. Somero, C. B. Osmond, and C. L. Bolis (ed.), *Water and life*, 1st ed. Springer-Verlag KG, Berlin.
- Crowe, J.H., Crowe, L. M., Carpenter, J. E., Petrelski, S., Hoekstra, F. A., De Araujo, P., Panek, A. D. (1997). Anhydrobiosis: cellular adaptation to extreme dehydration, in: W.H. Dantzler (Ed.), *Handbook of physiology*, Vol. II, Oxford University Press, Oxford, pp. 1445–1478.
- Crowe, J. H., Carpenter, J. F., Crowe, L. M. (1998). The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, 60: 73–103. doi: 10.1146/annurev.physiol.60.1.73.
- Cui, M., Hu, P., Wang, T., Tao, J., Zong, S. (2017). Differential transcriptome analyses reveal genes related to cold tolerance in seabuckthorn carpenter moth, *Eogystia hippophaecolus*. *PLoS One*, 12(11): e0187105. doi:10.1371/journal.pone.0187105.eCollection.
- Cytryn, E. J., Sangurdekar, D. P., Streeter, J. G., Franck, W. L., Chang, W., Stacey, G., Emerich, D. W., Joshi, T., Xu, D., Sadowsky, M. J. (2007). Transcriptional

- and physiological response of *Bradyrhizobium japonicum* to desiccation-induced stress. *Journal of Bacteriology*, 189(19): 6751-6762. doi:10.1128/JB.00 533-07.
- Danese, P. N., Pratt, L. A., Dove, S. L., Kolter, R. (2000). The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Molecular Microbiology*, 37(2): 424–432. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.02008.x.
- Deaker, R., Hartley, E., Gemell, G. (2012). Conditions affecting shelf-life of inoculated legume seed. *Agriculture*, 2(1): 38–51. doi: 10.3390/agriculture 2010038
- Deng, X., Li, Z., Zhang W. (2012). Transcriptome sequencing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis under desiccation and starvation stress in peanut oil. *Food Microbiology*, 30(1): 311–315. doi:10.1016/j.fm.2011.11.001
- Diderichsen, B. (1980). *flu*, a metastable gene controlling surface properties of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 141(2): 858-67. doi: 10.1128/JB.141.2.858-867.1980
- Du, X. J., Wang, X. Y., Dong, X., Li, P., Wang, S. (2018). Characterization of the desiccation tolerance of *Cronobacter sakazakii* strains. *Frontiers in Microbiology*, 9: 2867. doi:10.3389/fmicb.2018.02867.
- Dworkin, J., Shah, I. M. (2010). Exit from dormancy in microbial organisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8: 890–896. doi:10.1038 / nrmicro2453.
- Egan, S. M., Schleif, R. F. (1994). DNA-dependent renaturation of an insoluble DNA binding protein. Identification of the RhaS binding site at *rhaBAD*. *Journal of Molecular Biology*, 243(5): 821-9. doi: 10.1006/jmbi.1994.1684.
- Eselin, J., Santos, T., Hébraud, M. (2018). Desiccation: An environmental and food industry stress that bacteria commonly face. *Food Microbiology*, 69: 82-88. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.017>
- Feng, L., Roughley, R. J., Copeland, L. (2002). Morphological changes of Rhizobia in peat cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3): 1064–1070. doi: 10.1128 / AEM.68.3.1064-1070.2002
- Finn, S., Condell, O., McClure, P., Amézquita, A., Fanning, S. (2013). Mechanisms of survival, responses and source of *Salmonella* in low-moisture environments. *Frontiers in Microbiology*, 4: 331. doi:10.3389/fmicb.2013.00 331.
- Flemming, H-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14: 563–575. doi:10.1038/nrmicro.2016.94.

- Fujita, N., Mori, H., Yura, T., Ishihama, A. (1994). Systematic sequencing of the *Escherichia coli* genome: analysis of the 2.4-4.1 min (110,917-193,643 bp) region. *Nucleic Acids Research*, 22(9): 1637–1639. <https://doi.org/10.1093/nar/22.9.1637>
- Galperin, M. Y. (2010). Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Current opinion in microbiology*, 13(2): 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.005>
- Galvão, T. C., de Lorenzo, V., Cánovas, D. (2006). Uncoupling of choline-O-sulphate utilization from osmoprotection in *Pseudomonas putida*. *Molecular Microbiology*, 62(6): 1643-54. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05488.x.
- Garay-Arroyo, A., Colmenero-Flores, J. M., Garcarrubio, A., Covarrubias, A. A. (2000). Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 5668–5674. doi:10.1074/jbc.275.8.5668.
- Gayoso, C. M., Mateos, J., Méndez, J. A., Fernández-Puente, P., Rumbo, C., Tomás, Martínez de Ilarduya, O., Bou, G. (2014). Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Proteome Research*, 13(2): 460-476. doi:10.1021/pr400603f.
- Green, J. L., and Angell, C. A. (1988). Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly. *The Journal Physical Chemistry*, 93: 2880-2882. doi:10.1021 / j100345a006.
- Gul, N., and Poolman, B. (2013). Functional reconstitution and osmoregulatory properties of the ProU ABC transporter from *Escherichia coli*. *Molecular Membrane Biology*, 30(2): 138-48. doi: 10.3109/09687688.2012.754060.
- Gulez, G., Dechesne, A., Workman, C. T., Smets, B. F. (2012). Transcriptome dynamics of *Pseudomonas putida* KT2440 under water stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(3): 676-683. doi: 10.1128/aem.06150-11.
- Guo, X., Myasnikov, A. G., Chen, J., Crucifix, C., Papai, G., Takacs, M., Schultz, P., Weixlbaumer, A. (2018). Structural basis for NusA stabilized transcriptional pausing. *Molecular cell*, 69(5): 816–827.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.02.008>
- Hayden, J. D, Ades, S.E. (2008). The extracytoplasmic stress factor, σ^E , is required to maintain cell envelope integrity in *Escherichia coli*. *PLoS One* 3: e1573. doi:10.1371/journal.pone.0001573.
- Hingston, P. A., Piercey, M. J., Truelstrup Hansen, L. (2015). Genes associated with desiccation and osmotic stress in *Listeria monocytogenes* as revealed by

- insertional mutagenesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(16): 5350-5362. doi:10.1128/AEM.01134-15.
- Hishida, T., Han, Y. W., Shibata, T., Kubota, Y., Ishino, Y., Iwasaki, H., Shinagawa, H. (2004). Role of the *Escherichia coli* RecQ DNA helicase in SOS signaling and genome stabilization at stalled replication forks. *Genes & Development*, 1;18(15): 1886-97. doi: 10.1101/gad.1223804
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T. (2000). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Lippincott Williams and Wilkins, New York.
- Humann, J. L., Ziemkiewicz, H. T., Yurgel, S. N., Kahn, M. L. (2009). Regulatory and DNA repair genes contribute to the desiccation resistance of *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(2): 446-453. doi:10.1128/AEM.02207-08.
- Ito, T., Uozumi, N., Nakamura, T., Takayama, S., Matsuda, N., Aiba, H., Hemmi, H., Yoshimura, T. (2009). The implication of *YggT* of *Escherichia coli* in osmotic regulation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73(12): 2698-704. doi: 10.1271/bbb.90 558.
- Jones, P.G., VanBogelen, R.A., Neidhardt, F.C. (1987). Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 169(5): 2092-5. doi: 10.1128/jb.169.5.2092-2095.1987.
- Jonas, K., Edwards, A. N., Simm, R., Romeo, T., Römling, U., Melefors, O. (2008). The RNA binding protein CsrA controls cyclic di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins. *Molecular Microbiology*, 70(1): 236-57. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06411.x.
- Katoh, H., Asthana, R. K., Ohmori, M. (2004). Gene expression in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120 under desiccation. *Microbial Ecology*, 47: 164–174. doi:10.1007/s00248-003-1043-6.
- Kocharunchitt, C., King, T., Gobius, K., Bowman, J. P., Ross, T. (2014). Global genome response of *Escherichia coli* O157:H7 Sakai during dynamic changes in growth kinetics induced by abrupt downshift in water activity. *PLoS ONE*, 9: e90422. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090422>
- Korea, C. G., Badouraly, R., Prevost, M. C., Ghigo, J. M., Beloin, C. (2010). *Escherichia coli* K-12 possesses multiple cryptic but functional chaperone-usher fimbriae with distinct surface specificities. *Environmental Microbiology*, 12(7): 1957-77. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02202.x.
- Kranner, I., y Birtić, S. (2005). A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. *Integrative and Comparative Biology*, 45: 734–740, <https://doi.org/10.1093/icb/45.5.734>

- Krishnamurthi, R., Ghosh, S., Khedkar, S., Seshasayee, A. (2017). Repression of YdaS toxin is mediated by transcriptional repressor RacR in the cryptic *rac* prophage of *Escherichia coli* K-12. *mSphere*, 2(6): e00392-17. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00392-17>
- Landfald, B., and Strøm, A. R. (1986). Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 165(3): 849-55. doi: 10.1128/jb.165.3.849-855.1986.
- Langstraat, J., Bohse, M., Clegg, S. (2001). Type 3 fimbrial shaft (MrkA) of *Klebsiella pneumoniae*, but not the fimbrial adhesin (MrkD), facilitates biofilm formation. *Infection and Immunity*, 69(9): 5805–5812. <https://doi.org/10.1128/iai.69.9.5805-5812.2001>
- LeBlanc, J. C., Goncalves, E. R., Mohn, W. W. (2008). Global response to desiccation stress in the soil actinomycete *Rhodococcus jostii* RHA1. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(9): 2627-2636. doi: 10.1128/AEM.02711-07.
- Leblanc, S. K., Oates, C. W., Raivio, T. L. (2011). Characterization of the induction and cellular role of the BaeSR two-component envelope stress response of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 193(13): 3367–3375. <https://doi.org/10.1128/JB.01534-10>
- Lebre, P., De Maayer, P., Cowan, D. (2017). Xerotolerant bacteria: surviving through a dry spell. *Nature Reviews Microbiology*, 15(5): 285–296. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.16>
- Leprince, O., and Buitink, J. (2010). Desiccation tolerance: from genomics to the field. *Plant Science*, 179: 554-564. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.02.011>
- Leprince, O., and Buitink, J. (2015). Introduction to desiccation biology: from old borders to new frontiers. *Planta*, 242: 369-378. doi:10.1007 / s00425-015-2357-6.
- Leslie, S. B., Israelí, 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*, 10: 3592-3597. <https://doi.org/10.1128/AEM.61.10.3592-3597.1995>
- Limoli, D. H., Jones, C. J., Wozniak, D. J. (2015). Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbiology Spectrum*, 3(3), 10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014>
- McClelland, M., Florea, L., Sanderson, K., Clifton, S. W., Parkhill, J., Churcher, C., Dougan, G., Wilson, R. K., Miller, W. (2000). Comparison of the *Escherichia*

coli K-12 genome with sampled genomes of a *Klebsiella pneumoniae* and three *Salmonella enterica* serovars, Typhimurium, Typhi and Paratyphi. *Nucleic acids research*, 28(24): 4974–4986. <https://doi.org/10.1093/nar/28.24.4974>

MacConkey, A. 1905. Lactose-fermenting bacteria in feces. *J. Hyg.* 5:333-378.

Marchler-Bauer, A., Bo, Y., Han, L., He, J., Lanczycki, C. J., Lu, S., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Lu, F., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Wang, Z., Yamashita, R. A., Zhang, D., Zheng, C., Geer, L. Y., Bryant, S. H. (2017). CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Research*, 45(D1): D200-D203. doi: 10.1093/nar/gkw1129

Martínez-Romero, E., Silva-Sánchez, J., Barrios, H., Rodríguez-Medina, N., Martínez-Barnette, J., Téllez-Sosa, J., Gómez-Barreto, R. E., Garza-Ramos, U. (2015). Draft genome sequences of *Klebsiella variicola* plant isolates. *Genome Announcements*, 3(5): e01015-15. Published 2015 Sep 10. doi:10.1128/genomeA.01015-15

Maserati, A., Fink, R. C., Lourenco, A., Julius, M. L., Diez-Gonzalez, F. (2017). General response of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to desiccation: A new role for the virulence factors *sopD* and *sseD* in survival. *PLoS One*, 12(11): e0187692. doi: 10.1371/journal.pone.0187692.

Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics, p. 431–435. Cold Spring Harbor, N. Y, Cold Spring Harbor Laboratory.

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

Muñoz-Rojas, J. (2011). Desecación de bacterias benéficas y su impacto en agrobiotecnología: avances y retos. Seminario de Investigación y Cultura OSD. pp: 9-23.

Muñoz-Rojas, J., Bernal, P., Duque, E., Godoy, P., Segura, A., Ramos, J.-L. (2006). Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1): 472-7. doi: 10.1128/AEM.72.1.472-477.2006

Muñoz-Rojas, J., O. Rodríguez-Andrade., L. A. Pazos-Rojas., M. R. Bustillos-Cristales., A. Corral-Lugo., J. A. Munive., Y. E. Morales-García. (2008). Evaluación de la supervivencia de bacterias benéficas a la desecación ambiental. pp. 103. 4th International Meeting of Biotechnology. Granada, España.

- Mutnuri, S., Vasudevan, N., Kastner, M., Heipieper, H. J. (2005). Changes in fatty acid composition of *Chromobacter israelensis* with varying salt concentrations. *Current Microbiology*, 50 (3): 151–154. doi: 10.1007/s00284-004-4396-2
- Naghili, H., Tajik, H., Mardani, K., Razavi-Rouhani, S. M., Ehsani, A., Zare, P. (2013). Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. *Veterinary Research Forum*, 4(3): 179-83.
- Oliver, J. D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4): 415-425. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x
- Osterås, M., Boncompagni, E., Vincent, N., Poggi, M. C., Le Rudulier, D. (1998). Presence of a gene encoding choline sulfatase in *Sinorhizobium meliloti* bet operon: choline-O-sulfate is metabolized into glycine betaine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 95(19): 11394-11399. doi:10.1073/pnas.95.19.11394
- Pazos-Rojas L. A. 2011. Estudios biológicos sobre la desecación de *Pseudomonas putida* KT2440. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Microbiológicas. Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Pazos-Rojas, L. A., Muñoz-Arenas, L. C., Rodríguez-Andrade, O., López-Cruz, L. E., López-Ortega, O., López-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. (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>
- Pazos-Rojas, L. A., Rodríguez-Andrade, O., Muñoz-Arenas, L. C., Morales-García, Y. E., Corral-Lugo, A., Quintero-Hernández, V., Baez, A., Molina-Romero, D., Muñoz-Rojas, J. (2018). Desiccation-tolerant rizobacteria maintain their plant growth-promoting capability after experiencing extreme water stress. *Journal of Applied Microbiology*, 1(1): 1-13. doi: 10.23959 / sfjam-100005
- Pocard, J. A, Vincent, N., Boncompagni, E., Smith, L. T., Poggi, M. C, Le Rudulier, D. (1997). Molecular characterization of the bet genes encoding glycine betaine synthesis in *Sinorhizobium meliloti* 102F34. *Microbiology (Reading)*, 143 (Pt 4):1369-79. doi: 10.1099/00221287-143-4-1369.
- Potts, M. (1994). Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiological Reviews*, 58(4): 755-805.
- Potts, M. (2001). Desiccation tolerance: a simple process? *TRENDS in Microbiology*, 9(11): 553-559. doi: 10.1016 / S0966-842X (01) 02231-4

- Potts, M., Slaughter, S. M., Hunneke, F. U., Garst, J. F., Helm, R. F. (2005). Desiccation tolerance of prokaryotes: application of principles to human cells. *Integrative and Comparative Biology*, 45(5): 800–809. doi:10.1093/icb/45.5.800
- Rättö, M., Verhoef, R., Suihko, M. L., Blanco A., Schols, H. A., Voragen, A. G., Wilting, R., Siika-Aho, M., Buchert, J. (2006). Colanic acid is an exopolysaccharide common to many enterobacteria isolated from paper-machine slimes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(5): 359-67. doi: 10.1007/s10295-005-0064-1.
- Riedel, K., and Lehner A. (2002). Identification of proteins involved in osmotic stress response in *Enterobacter sakazakii* by proteomics. *Proteomics*, 7(8): 1217–1231. doi:10.1002/pmic.200600536
- Rippin, M., Becker, B., Holzinger, A. (2017). Enhanced desiccation tolerance in mature cultures of the streptophytic green alga *Zygnema circumcarinatum* revealed by transcriptomics. *Plant and Cell Physiology*, 58(12): 2067-2084. doi:10.1093/pcp/pcx136
- Rittershaus, E. S., S. H. Baek., C. M. Sasseti. (2013). The normalcy of dormancy: common themes in microbial quiescence. *Cell Host and Microbe*, 13(6): 643–651.
- Rodríguez-Andrade, O. (2011). Búsqueda de mutantes sensibles a estrés producido por congelación-descongelación y su relación con la desecación-rehidratación, usando como modelo a *Klebsiella variicola* T29A2. Tesis de maestría, Posgrado de Ciencias Microbiológicas. Instituto de Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Rodríguez-Andrade, O., Bernal, P., Martínez-Contreras, R. D., Morales-García, Y. E., Molina-Romero, D., Marín-Cevada, V., Rivera-Urbalejo, A. P., Muñoz-Rojas, J. (2018). Estrategias bacterianas para contrarrestar el estrés causado por frío y/o por congelación-descongelación y panorama de tolerancia de las rizobacterias. *Alianzas y Tendencias-BUAP*, 3(10): 1-13.
- Rodríguez-Andrade, O., Corral-Lugo, A., Morales-García, Y. E., Quintero-Hernández, V., Rivera-Urbalejo, A. P., Molina-Romero, D., Martínez-Contreras, R. D., Bernal, P., Muñoz-Rojas, J. (2019). Identification of *Klebsiella variicola* T29A genes involved in tolerance to desiccation. *The Open Microbiology Journal*, 13: 256-267. doi: 10.2174/1874285801913010256
- Rodríguez-Salazar, J., Moreno, S., Espín, G. (2017). LEA proteins are involved in cyst desiccation resistance and other abiotic stresses in *Azotobacter vinelandii*. *Cell Stress Chaperones*, 22(3): 397-408. doi: 10.1007/s12192-017-0781-1.

- Romantsov, T., Guan, Z., Wood, J. M. (2009). Cardiolipin and the osmotic stress responses of bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(10): 2092–2100. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.06.010>
- Santos, H., and Da Costa, M. S. (2002). Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments. *Environmental Microbiology*, 4(9): 501–509. doi: 10.1046 / j.1462-2920.2002.00335.x
- Setlow, P. (2014). The germination of spores of *Bacillus* species: what we know and don't know. *Journal of Bacteriology*, 196(7): 1297–1305. doi:10.1128/JB.01455-13
- Sghaier, H., Ghedira, K., Benkahla, A., Barkallah, I. (2008). Basal DNA repair machinery is subject to positive selection in ionizing-radiation-resistant bacteria. *BMC Genomics*, 9(297). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-297>
- Shirkey, B., Kovarcik, D. P., Wright, D. J., Wilmoth, G., Prickett, T. F., Helm, R. F., Gregory, E. M., Potts, M. (2000). Active Fe-containing superoxide dismutase and abundant *sodF* mRNA in *Nostoc commune* (cyanobacteria) after years of desiccation. *Journal of Bacteriology*, 182(1): 189–197. doi:10.1128/jb.182.1.189-197.2000
- Singh, A. K., Yadav, S., Chauhan, B. S., Nandy, N., Singh, R., Neogi, K., Roy, J. K., Srikrishna, S., Singh, R. K., Prakash, P. (2019). Classification of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* based on their *in vitro* biofilm forming capabilities and elucidation of the biofilm matrix chemistry with special reference to the protein content. *Frontiers in Microbiology*, 10: 669. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00669>
- Singh, J., Kumar, D., Ramakrishnan, N., Singhal, N., Jervis, J., Garst, J. F., Slaughter, S. M., DeSantis, A. M., Potts, M., Helm, R. F. (2005). Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to desiccation and rehydration. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12): 8752-8763. doi: 10.1128 / AEM.71.12.8752-8763.2005
- Smirnova, G. V., and Oktyabrsky, O. N. (2005). Glutathione in bacteria. *Biochemistry (Moscow)*, 70(11): 1199–1211. <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0248-3>
- Stevenson, G., Andrianopoulos, K., Hobbs, M., Reeves, P. R. (1996). Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *Journal of Bacteriology*, 178(16): 4885-4893. doi: 10.1128/jb.178.16.4885-4893.1996.
- Stock, A. M., Robinson, V. L., Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 69: 183-215. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.183. PMID: 10966457.

- Stokell, J. R. and Steck, T. R. (2012). Viable but nonculturable bacteria. In eLS, (Ed.). doi:10.1002/9780470015902.a0000407.pub2
- Strøm, A. R. and Kaasen, I. (1993). Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. *Molecular Microbiology*, 8(2): 205-210. doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01564.x. PMID: 8391102
- Sugawara, M., Cytryn, E. J., Sadowsky, M. J. (2010). Functional role of *Bradyrhizobium japonicum* trehalose biosynthesis and metabolism genes during physiological stress and nodulation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(4): 1071-1081. doi: 10.1128/AEM.02483-09
- Suzuki, H., Koyanagi, T., Izuka, S., Onishi, A., Kumagai, H. (2005). The *yliA*, *-B*, *-C*, and *-D* genes of *Escherichia coli* K-12 encode a novel glutathione importer with an ATP-binding cassette. *Journal of Bacteriology*, 187(17): 5861–5867. <https://doi.org/10.1128/JB.187.17.5861-5867>
- Szent-Gyorgyi, A. (1956). Bioenergetics. *Science*, 124(3227): 873-875. <https://science.sciencemag.org/content/124/3227/873>
- Truelstrup H. L., and Vogel, B. F. (2011). Desiccation of adhering and biofilm *Listeria monocytogenes* on stainless steel: survival and transfer to salmon products. *International Journal of Food Microbiology*, 146(1): 88-93. doi: 10.1016 / j.ijfoodmicro.2011.01.032
- Vanderlinde, E. M., Harrison, J. J., Muszyński, A., Carlson, R. W., Turner, R. J., Yost, C. K. (2010). Identification of a novel ABC transporter required for desiccation tolerance, and biofilm formation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841, *FEMS Microbiology Ecology*, 71(3): 327-40. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00824.x>
- Vriezen, J. A., de Bruijn, F. J., Nüsslein, K. R. (2012). Desiccation induces viable but non-culturable cells in *Sinorhizobium meliloti* 1021. *AMB Express*, 2(1): 6. doi: 10.1186 / 2191-0855-2-6
- Whitby, M. C., Vincent, S. D., Lloyd, R. G. (1994). Branch migration of holliday junctions: identification of RecG protein as a junction specific DNA helicase. *EMBO Journal*, 13(21): 5220-5228
- Xu, D., Duan, X., Wang, B., Hong, B., Ho, T., Wu, R. (1996). Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiology*, 110(1): 249-257. doi:10.1104/pp.110.1.249

12. Anexos

12.1 Anexo 1. Composición de medios de cultivos MM9-Glucosa, LB y MacConkey

Medio	Composición
MM9-Glucosa	<ul style="list-style-type: none"> • 100 ml/L de solución 10X de sales M9 <ul style="list-style-type: none"> Na₂HPO₄ 70 g/L KH₂PO₄ 30 g/L NaCl 5 g/L NH₄Cl 10 g/L • 1 ml/L de citrato férrico (6 g/L) • 2.5 ml/L de solución de elementos traza <ul style="list-style-type: none"> ZnCl₂ 50 mg/L MnCl₂•4H₂O 30 mg/L BO₃H₃ 300 mg/L CoCl₂ 200 mg/L CuCl₂•2H₂O 10 mg/L NiCl₂•6H₂O 20 mg/L NaMoO₄•2H₂O 30 mg/L • 1 ml de MgSO₄•7H₂O 1M • 20 ml/L de glucosa al 20% • 15 g/L de agar (medio sólido) • Kanamicina (Km) a concentración final de 80 µg/ml (exclusivamente cepa BetR)
Luria Bertani LB	<ul style="list-style-type: none"> • Extracto de levadura 5 g/L • NaCl 10 g/L • Peptona de caseína 10 g/L • 15 g/L de agar (medio sólido) • Kanamicina (Km) a concentración final de 80 µg/ml (únicamente cepa BetR)
MacConkey	<ul style="list-style-type: none"> • Peptona de gelatina 17 g/L • Peptona de caseína 1.5 g/L • Peptona de carne 1.5 g/L • Lactosa 10 g/L • Sales biliares 1.5 g/L • Cloruro de sodio 5 g/L • Rojo neutro 0.03 g/L • Cristal violeta 0.001 g/L • Agar 13.5 g/L

12.2 Anexo 2. Clasificación por anotación de los genes *Up* y *Down* regulados de la cepa T29A

Lista de genes <i>Up</i> regulados T29A (después de doce días de desecación ambiental)			
Grupo por anotación	ID	Z-Score (2.0)	Función
Metabolismo de lípidos	<i>fabH</i>		3-oxoacil- [proteína acarreadora de acilo] sintasa III
	<i>fabB</i>	3.141	3-oxoacil- [proteína acarreadora de acilo] sintetasa I
	<i>atoB</i>	3.279	acetil-CoA acetiltransferasa
	b2253	4.176	uridina 5´-(beta-1-treo-pentapiranosil-4-ulosa difosfato) aminotransferasa dependiente de PLP
	<i>yiaH</i>		O-acetiltransferasa predicha
	<i>wcaB</i>		acil transferasa putativa
	<i>gspA</i>		glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
Transporte transmembrana (facilitadores)	<i>yceL</i>		Bomba de eflujo de multidrogas <i>mdtH</i>
	<i>yidY</i>		Proteína del sistema de eflujo multidrogas (<i>mdtL</i>)
	<i>mhpT</i>		Transportador de 3-hidroxifenilpropionico
	uhpC	2.806	Proteína de membrana interna que detecta glucosa-6-fosfato
	<i>uhpT</i>		antitransportador que intercambia fosfato citoplasmático por hexosa-6-fosfato
	<i>cynX</i>		Transportador de cianato
Proteasas	<i>sohB</i>		Proteína de la familia de peptidasas S49, proteína de membrana interna
	<i>clpP</i>		Serina proteasa dependiente de ATP, subunidad proteolítica de ClpA-ClpP y ClpX-ClpP
	<i>ptrB</i>		Proteasa II
	<i>pepN</i>		Aminopeptidasa N
Helicasa, reparación y daño ADN, ATPasa	b0539		Exonucleasa predicha
	<i>tra5-1</i>		InsF es una de las tres proteínas codificadas por el elemento de inserción IS3
	<i>yaeO</i>		modulador de la terminación de la transcripción dependiente de Rho
	recQ	4.428	Helicasa de ADN dependiente de ATP
	<i>recG</i>		Helicasa de ADN dependiente de ATP
	<i>mfd</i>		factor de acoplamiento de transcripción-reparación, Mfd disocia los complejos de alargamiento de la transcripción bloqueados en lesiones no apareadoras y media el reclutamiento de proteínas de reparación de ADN.
	<i>rtcB</i>		Ligasa de RNA
	<i>rho</i>		Factor de terminación de la transcripción
	<i>yeiR</i>		GTPasa estimulada por Zn, homeostasis del zinc
<i>oppF</i>		Transportador ABC de oligopéptidos con actividad de ATPasa	

	<i>ffh</i>	3.037	Componente de partícula de reconocimiento de señal (SRP) con ARN 4.5S (<i>ffs</i>)
	<i>hypB</i>		Hidrolasa de GTP involucrada en unir níquel a hidrogenasas
	<i>nagE</i>		Componente del sistema de fosfotransferencia de N-acetilglucosamina
	<i>yiaA</i>		Proteína de membrana interna de la familia YiaAB
	<i>ybiN</i>		metiltransferasa responsable de la metilación de 23S rRNA en la posición N6 del nucleótido A1618.
	<i>yhcG</i>		Proteína que contiene el dominio DUF1016, YhcG es miembro de la superfamilia PD- (D / E) XK con dominios de nucleasa altamente divergentes.
	<i>yicP</i>		adenina deaminasa
	<i>yigN</i>	3.55	Proteína limitante de recombinación
	<i>ycdT</i>	5.417	Diguanilato ciclasa anclada a membrana
GTP (unión o GTPasa)	<i>yeiR</i>		GTPasa estimulado por Zn, homeostasis del zinc
	<i>ffh</i>		Componente de partícula de reconocimiento de señal (SRP) con ARN 4.5S (<i>ffs</i>)
	<i>hypB</i>		GTPasa estimulado por Zn, homeostasis del zinc
Proteínas de Membrana	<i>ychM</i>	3.526	Transportador predicho
	<i>hlpA</i>		Chaperona periplasmática
	<i>yccC</i>		Etk es una proteína tirosina quinasa de la membrana interna que se autofosforila y puede ser desfosforilada por Etp.
	<i>phoU</i>	3.061	Regulador negativo del pho regulón PhoR/PhoB
	<i>ylcD</i>		Proteína de membrana, eflujo de cobre/plata
	<i>fixX</i>		Proteína tipo ferredoxina 4Fe-4S putativa
	<i>ygiD</i>		YgiD está involucrado en la formación de biopelículas en la orina
	<i>ycdW</i>		Glioxilato/hidroxipiruvato reductasa A
	<i>yieC</i>		Porina de membrana externa específica de carbohidrato
	<i>yjiN</i>	3.94	Autotransportador para la formación de biopelícula variable de fase
	<i>ybcU</i>		lipoproteína putativa
	<i>pepN</i>		Aminopeptidasa N
	<i>fliG</i>		Componente de energización y conmutación del motor flagelar
	<i>glpC</i>		Subunidad C de la deshidrogenasa de glicerol-3-fosfato, asociada a la tolerancia a disolventes orgánicos
	<i>oppF</i>		Transportador ABC de oligopéptidos con actividad de ATPasa
	<i>yoal</i>		Componente de membrana no caracterizado
	<i>ycfJ</i>	4.028	Componente de membrana no caracterizado
	<i>yggT</i>	3.039	Proteína de membrana putativa
	<i>yjiN</i>		Proteína de membrana interna
	b0847		Transportador putativo
	b0832	3.069	Importador de Glutación, permeasa transportador ABC (<i>gsiD</i>)
	<i>ybdG</i>	3.215	Canal mecanosensible de miniconductancia
	<i>sdhD</i>		Succinato deshidrogenasa, subunidad de membrana
	<i>yhdX</i>		Permeasa de aminoácidos putativa, transportador ABC
	<i>cynX</i>		Transportador de cianato
	<i>nagE</i>		Componente del sistema de fosfotransferencia de N-acetilglucosamina
	<i>ftsN</i>		Proteína esencial de la división celular
	<i>yiaH</i>		O-acetiltransferasa predicha
	<i>yiaA</i>		Proteína de membrana interna de la familia YiaAB
	<i>uhpC</i>	2.806	Proteína de membrana interna que detecta glucosa-6-fosfato
	<i>ycdT</i>	5.417	Diguanilato ciclasa anclada a membrana

	b2832	3.821	Proteína de membrana interna de la familia UPF0053
	<i>yphA</i>		Proteína de membrana interna de la familia DoxX
	<i>focB</i>		Transportador putativo de formiato y nitrito
	<i>ycdG</i>		Permeasa de pirimidina
	ccmC	6.116	Permeasa exportadora de hemo tipo transportador ABC, biosíntesis del citocromo C
	<i>lgt</i>		Biosíntesis de lipoproteínas, fosfatidilglicerol - prolipoproteína diacilgliceril transferasa
	<i>yceL</i>		Bomba de eflujo de multidroga (<i>mdtH</i>)
	<i>yhaO</i>		Transportador putativo
	<i>proW</i>		Permeasa de glicina/betaína Transportador ABC
	<i>yidY</i>		Proteína del sistema de eflujo multidroga (<i>mdtL</i>)
	<i>uhpT</i>		Antitransportador que intercambia fosfato citoplasmático por hexosa-6-fosfato
	<i>mhpT</i>		Transportador de ácido 3-hidroxifenilpropiónico
	<i>sohB</i>		Proteína de membrana interna
	<i>yehM</i>		Transportador de ácido carboxílico C4
	<i>ygjU</i>		Simporter sodio: serina/treonina
	yghQ	3.247	Supuesta flipasa de polisacáridos de membrana
	<i>insF</i>		Transposasa B
	<i>dps</i>		Proteína de unión y almacenaje de Fe
	chpB	3.539	Endoribonucleasa de secuencia específica, componente del sistema de toxina -antitoxina ChpB-ChpS
	recQ	4.428	Helicasa de ADN dependiente de ATP
	<i>recG</i>		Helicasa de ADN dependiente de ATP
	<i>mfd</i>		factor de acoplamiento de transcripción-reparación, Mfd disocia los complejos de alargamiento de la transcripción bloqueados en lesiones no apareadoras y media el reclutamiento de proteínas de reparación de ADN.
	<i>nusA</i>		factor L terminación transcripción/anti-terminación
	<i>rho</i>		Factor de terminación de la transcripción
	<i>baeR</i>		La proteína reguladora transcripcional BaeR es parte del sistema de transducción de señales BaeS / BaeR de dos componentes. Resistencia
	ydaR	3.395	<i>racR</i> codifica para un represor del profago RAC. RacR es un represor de <i>ydaS-T</i>, y este módulo es un ejemplo de un sistema "represor de toxinas", donde la toxicidad de YdaS se reprime totalmente a nivel transcripcional.
	<i>cspG</i>		La expresión de <i>cspG</i> se induce con el choque frío/bloqueo de síntesis de proteínas
	<i>ascG</i>		Represor del operón críptico (<i>ascFB</i>) cuyos genes están involucrados en el transporte y la utilización de los azúcares glucósidos arbutina, salicina y celobiosa
	rpiR	3.167	Represor transcripcional de unión al ADN AlsR. Catabolismo de D-alose, regulación de la expresión de la expresión del regulón alosa y ribosa
	<i>narL</i>		NarL es un modelo de regulador de respuesta para la transducción de señales bacterianas de dos componentes. Genes involucrados en la respiración de nitrato durante la anaerobiosis.
	<i>rhaS</i>		activador transcripcional de <i>rhaBAD</i>
	<i>rhaR</i>		activador transcripcional de <i>rhaS</i>
	<i>araC</i>		Activador transcripcional del regulón <i>ara</i> ; autorrepresor
	<i>fbp</i>		Fructosa 1,6-bifosfatasa I
Reguladores transcripcionales, unión al ADN			

ATP (unión o ATPasa), unión a nucleótido	<i>ycdT</i>	5.417	Diguanilato ciclasa anclada a membrana
	<i>ffh</i>		Componente de partícula de reconocimiento de señal (SRP) con ARN 4.5S (<i>ffs</i>)
	<i>hypB</i>		GTPasa estimulada por Zn, homeostasis del zinc
	<i>yeiR</i>		GTPasa estimulada por Zn, homeostasis del zinc
	<i>gsp</i>		Glutación espermidina sintasa
	b1398		Fenilacetil-CoA ligasa
	<i>narL</i>		NarL es un modelo de regulador de respuesta para la transducción de señales bacterianas de dos componentes. Genes involucrados en la respiración de nitrato durante la anaerobiosis.
	<i>rnc</i>	3.173	RNasa III
	<i>pdxK</i>		Piridoxal-piridoxamina quinasa/hidroximetilpirimidina quinasa
	<i>serS</i>	3.192	Serina-tRNA sintasa
	<i>aceK</i>		Isocitrato deshidrogenasa quinasa/fosfatasa
	<i>yjcT</i>	4.034	D-alosa quinasa
	<i>pgk</i>		Fosfoglicerato quinasa
	<i>recQ</i>	4.428	Helicasa de ADN dependiente de ATP
	<i>mfd</i>		Factor de acoplamiento de transcripción-reparación, Mfd disocia los complejos de alargamiento de la transcripción bloqueados en lesiones no apareadoras y media el reclutamiento de proteínas de reparación de ADN.
	<i>oppF</i>		Transportador ABC de oligopéptidos con actividad de ATPasa
	<i>rho</i>		Factor de terminación de la transcripción
<i>recG</i>		Helicasa de ADN dependiente de ATP	
<i>ybbA</i>		Componente de unión a ATP de un transportador de captación de metabolitos de la superfamilia ABC predicha	
Metabolismo (carbono, glucólisis/gluconeogénesis)	<i>tdcB</i>		Treonina deshidratasa catabólica que lleva a cabo el primer paso en la degradación de la treonina y serina
	b1398		Fenilacetil-CoA ligasa
	<i>yjcT</i>	4.034	D-alosa quinasa
	<i>mhpA</i>		3-(3-hidroxifenil) propionato hidrolasa
	<i>gpsA</i>	2.905	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
	<i>ubiX</i>		3-octaprenil-4-hidroxibenzoato carboxi liasa
	<i>hemG</i>		Protoporfirina oxidasa, flavoproteína
	<i>hemH</i>		Ferroquetalasa
	<i>hisD</i>		Histidinol deshidrogenasa
	<i>glpC</i>		Subunidad C de la deshidrogenasa de glicerol-3-fosfato, asociada a la tolerancia a disolventes orgánicos
	<i>proC</i>		Pirrolina-5-carboxilato reductasa, unión a NAD
	<i>entA</i>		2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato deshidrogenasa
	<i>ycdW</i>		Glioxilato/hidroxipiruvato reductasa A
	<i>atoB</i>	3.279	acetil-CoA acetiltransferasa
	<i>sdhD</i>		succinato deshidrogenasa, subunidad de membrana
	<i>fbp</i>		Fructosa 1,6-bifosfatasa I
	<i>pgk</i>		Fosfoglicerato quinasa
	<i>gpmM</i>		Fosfoglicero mutasa III, co-factor independiente
	<i>egbA</i>		Subunidad alfa de la beta-D-galactosidasa críptica
	<i>goaG</i>		4-aminobutirato transaminasa (<i>puuE</i>)
	<i>yibO</i>		2,3-bisfosfoglicerato-independiente de fosfoglicerato mutasa
	<i>yigL</i>	3.453	YigL es una fosfatasa que pertenece a la superfamilia de las hidrolasas similares a halohalogenasa dehalogenasa (HAD).
<i>ycdW</i>		Glioxilato/hidroxipiruvato reductasa A	

	<i>ptsO</i>		NPr, el producto de <i>ptsO</i> , es homólogo a la proteína HPr del sistema de fosfotransferasa (PTS) dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP).	
	<i>selA</i>		Selenocisteína sintasa	
	<i>ybdB</i>		Tioesterasa involucrada en la síntesis de enterobactina	
	<i>moeA</i>		Proteína de biosíntesis de molibdopterina	
NAD (unión), oxidoreductasas	<i>mhpF-r</i>		Acetaldehído-CoA deshidrogenasa II, unión a NAD	
	<i>yjeF</i>		NAD (P) HX epimerasa / NAD (P) HX deshidratasa	
	<i>atoB</i>	3.279	Acetil-CoA acetiltransferasa	
	<i>pdxK</i>		Piridoxal-piridoxamina quinasa/hidroximetilpirimidina quinasa	
	<i>fbp</i>		Fructosa 1,6-bifosfatasa I	
	<i>pgk</i>		Fosfoglicerato quinasa	
	<i>dps</i>		Proteína de unión y almacenamiento de Fe	
	<i>ygiD</i>		YgiD está involucrado en la formación de biopelículas en la orina	
	<i>hemG</i>		Protoporfirina oxidasa, flavoproteína	
	<i>yajO</i>		2-carboxibenzaldehído reductasa	
	<i>sodA</i>		Superóxido dismutasa, Mn	
	<i>proC</i>		Pirrolina-5-carboxilato reductasa, unión a NAD	
	<i>mhpA</i>		3-(3-hidroxifenil) propionato hidrolasa	
	<i>ycdW</i>		Glioxilato/hidroxipiruvato reductasa A	
	<i>hisD</i>		Histidinol deshidrogenasa	
	<i>entA</i>		2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato deshidrogenasa	
	<i>kduD</i>		2-dehidro-3-deoxi-D-gluconato 5-deshidrogenasa (oxidorreductasa)	
		<i>gpsA</i>	2.905	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
	Transferasas fosfato pirodaxal	<i>selA</i>		Selenocisteína sintasa
		b2253	4.176	Uridina 5´-(beta-1-treo-pentapiranosil-4-ulosa difosfato) aminotransferasa dependiente de PLP
<i>goaG</i>			4-aminobutirato transaminasa (<i>puuE</i>)	
Transportadores ABC	<i>ccmC</i>	6.116	Permeasa exportadora de hemo transportador ABC, biosíntesis del citocromo C	
	<i>oppF</i>		Transportador ABC de oligopéptidos con actividad de ATPasa	
	<i>yhdX</i>		Permeasa de aminoácidos putativa, transportador ABC	
	b0832	3.069	Importador de Glutación, permeasa transportador ABC (<i>gsiD</i>)	
	<i>proW</i>		Permeasa de glicina/betaína Transportador ABC	
Hidrolasas de nucleótido trifosfato	<i>mfd</i>		factor de acoplamiento de transcripción-reparación, Mfd disocia los complejos de alargamiento de la transcripción bloqueados en lesiones no apareadoras y media el reclutamiento de proteínas de reparación de ADN.	
	<i>recG</i>		Helicasa de ADN dependiente de ATP	
	<i>hypB</i>		GTPasa estimulada por Zn, homeostasis del zinc	
	<i>yeiR</i>		GTPasa estimulada por Zn, homeostasis del zinc	
	<i>recQ</i>	4.428	Helicasa de ADN dependiente de ATP	
	<i>rho</i>		Factor de terminación de la transcripción	
	<i>oppF</i>		Transportador ABC de oligopéptidos con actividad de ATPasa	
	<i>ffh</i>	3.037	Componente de partícula de reconocimiento de señal (SRP) con ARN 4.5S (<i>ffs</i>)	
Hierro/Azufre	<i>glpC</i>		subunidad C de la deshidrogenasa de glicerol-3-fosfato, asociada a la tolerancia a disolventes orgánicos	
	<i>fixX</i>		proteína tipo ferredoxina 4Fe-4S putativa	
	<i>thiC</i>		Proteína putativa tipo ferredoxina 4Fe-4S	
	<i>sdhD</i>		succinato deshidrogenasa, subunidad de membrana	
	<i>hemH</i>		Ferroquetalasa	
	<i>dps</i>		Proteína de unión y almacenamiento de Fe, proteína de unión al ADN inducible por estrés	

Proteínas de membrana externa	<i>cynX</i>		Transportador de cianato
	<i>fkpA</i>	3.102	peptidil-prolil cis-trans-isomerasa tipo FKBP (rotamasa)
	<i>yfhG</i>		proteína putativa de membrana externa que modula la respuesta QseEF
	<i>skp</i>		chaperona periplasmática
	<i>ylcD</i>		Proteína de membrana, eflujo de cobre/plata
	<i>ybcU</i>		lipoproteína putativa
	<i>yieC</i>		porina de membrana externa específica de carbohidrato
	b1583		Proteína putativa periplasmática de la familia UPF0482
<i>flu</i>	3.94	autotransportador para la formación de biopelícula variable de fase	
Otros (Proteínas conservadas o predichas)	<i>ygeF</i>		Proteína hipotética
	b3808		Proteína predicha
	b2970		Proteína predicha de vía secretoria
	b2655		proteína hipotética
	<i>yjiQ</i>		proteína hipotética
	<i>yiiS</i>		Proteína que contiene el dominio DUF406 YiiS
	<i>rpmG</i>		proteína L33 subunidad ribosomal 50S
	AAC	3.283	Proteína Yoal
	<i>yohH</i>		Proteína conservada
	b0165	4.116	proteína hipotética
	<i>yjgA</i>		Proteína conservada
	<i>yjcZ</i>		Proteína conservada
	<i>yqgC</i>		proteína predicha
	b1777	3.328	Proteína conservada
	<i>racC</i>		Proteína predicha
	b1423	3.7	Proteína conservada
	<i>rhoL</i>		Péptido líder del operón Rho
<i>ydbD</i>		Proteína predicha	
<i>fr</i>	3.505	factor de reciclaje de ribosomas	

Lista de Genes *Down* regulados T29A (después de doce días de desecación ambiental)

Grupo por anotación	ID	Z-Score (2.0)	Función
Lípidos (Unión o proteínas)	<i>ygiM</i>	-3.946	Proteína de dominio SH3
	<i>amtB</i>		Transportador de amonio
	<i>yjiQ</i>	-3.124	Supuesta proteína periplásmica de la familia DUF1454
	<i>glnH</i>		Subunidad transportadora de glutamina
	<i>yacK</i>		Oxidasa multicobre (lacasa) <i>cueO</i>
	<i>nfrA</i>		Receptor del bacteriófago N4, subunidad de la membrana externa
	<i>yshA</i>	-4.002	Porina L de membrana externa; sulfina lipídica putativa (<i>ompL</i>)
	<i>phoE</i>	-5.418	Fosforina de membrana externa
	<i>rscF</i>		supuesta proteína de membrana externa
	b2809		Lipoproteína de la familia DUF903 (<i>ygdI</i>)
	<i>yedD</i>		lipoproteína

	b1550		Qin Profago, proteína predicha (<i>gnsB</i>) GnsA y GnsB afectan la abundancia de ácidos grasos insaturados y la fluidez de la membrana
Hierro/Azufre	<i>mhpB</i>	-3.231	2,3-dihidroxifenilpropionato 1,2-dioxigenasa
	<i>ybaX</i>		7-ciano-7-deazaguanina (<i>preQ0</i>) sintasa; biosíntesis de queuosina (<i>queC</i>)
	<i>cca</i>		ARNt nucleotidil transferasa fusionada / 2'3'-fosfodiesterasa cíclica / 2'nucleotidasa y fosfatasa
	<i>dnaJ</i>		Chaperona Hsp40, DnaK co-chaperona
	<i>yacK</i>		Oxidasa multicobre (lacasa) <i>cueO</i>
	<i>yggF</i>	-4.643	Fructosa 1,6 bisfosfatasa isoenzima
	<i>ygaG</i>	-4.449	S-ribosilhomocisteína liasa (<i>luxS</i>)
	<i>narG</i>		Nitrato reductasa 1, subunidad alfa
	<i>nth</i>		ADN glicosilasa y apirimidínico (AP) liasa (endonucleasa III)
	<i>ygiQ</i>		Proteína radical de la superfamilia SAM
	<i>fixX</i>		Supuesta proteína 4Fe-4S de tipo ferredoxina
	<i>gcpE</i>		1-hidroxi-2-metil-2- (E) -butenil 4-difosfato sintasa (<i>ispG</i>)
	<i>thiH</i>	-3.384	Tirosina liasa, implicada en la síntesis del resto tiamina-tiazol
<i>yfhE</i>		co-chaperona para la biosíntesis de racimo [Fe-S]	
Reguladores transcripcionales o unión al ADN	<i>ycaJ</i>	-3.577	Factor de recombinación dependiente de ADN, la proteína RarA puede desempeñar un papel en la recombinación asociada con la replicación del ADN
	<i>intE</i>	-4.584	e14 profagia; supuesta integrasa
	<i>dnaE</i>		Subunidad alfa de ADN polimerasa III
	<i>yccB</i>		Proteína de choque térmico implicada en la degradación del mutante DnaA; proteína de unión a ADN oriC hemimetilada
	<i>nth</i>		ADN glicosilasa y apirimidínico (AP) liasa (endonucleasa III)
	b2981		Supuesto regulador transcripcional de unión al ADN
	<i>ftsK</i>		Translocasa de ADN en el anillo septal que clasifica los cromosomas hijos
	<i>relE</i>	-3.516	Qin profagia; toxina del sistema RelE-RelB toxina-antitoxina
	<i>cspE</i>	-3.367	proteína de antiterminación de la transcripción de la familia constitutiva de choque frío; regulador negativo de la transcripción de <i>cspA</i>; Proteína de fusión de ARN; Proteína de unión a ADNss
	<i>cspB</i>	-3.309	Qin profagia; proteína de choque frío
	<i>yhdM</i>		Activador transcripcional del gen <i>zntA</i>
	<i>yccV</i>	-6.218	Proteína unión a ADN hemimetilado
	<i>yabN</i>	-3.929	Activador transcripcional de unión a ADN transcripcional de <i>sgrS</i> sRNA
	<i>metJ</i>		represor transcripcional, unión a S-adenosilmetionina
	<i>exuR</i>		represor transcripcional del regulón de hexulonato; autorepresor
	<i>leuO</i>	-5.754	Factor de transcripción global
	<i>nac</i>		Regulador transcripcional de asimilación de nitrógeno; autorrepresor
	<i>yhbY</i>		Supuesta proteína de unión a ARN
	<i>apt</i>		Adenina fosforibosiltransferasa
<i>yadD</i>	-3.474	Transposasa predicha	
Proteínas de membrana	<i>rscF</i>		Supuesta proteína de membrana externa
	<i>bamD</i>		BamABCDE complejo OM biogénesis lipoproteína
	<i>nfrA</i>		Receptor del bacteriófago N4, subunidad de la membrana externa
	<i>yshA</i>	-4.002	Porina L de membrana externa; putativa sulfina lipídica
	<i>phoE</i>	-5.418	Proteína E de la fosfoporina de la membrana externa
	<i>narG</i>		Nitrato reductasa 1, subunidad alfa

	<i>gatC</i>		Componente EIIC del sistema PTS específico de galactitol
	b1591	-4.495	Proteína de unión al líder gemelo-arginina para DmsA y TorA
	<i>pqiC</i>		Lipoproteína putativa de la familia DUF330
	<i>sslE</i>		Lipoproteína
	<i>yedD</i>		Lipoproteína
	b2809		Lipoproteína de la familia DUF903
	ygiM	-3.946	Proteína de dominio SH3
	<i>gltJ</i>		Glutamato/aspartato transportador ABC permeasa
	<i>rseP</i>		Metaloproteasa de membrana interna de zinc RIP; Activador de RpoE, degradando RseA; péptido señal escindido endoproteasa
	<i>ftsK</i>		Translocasa de ADN en el anillo septal que clasifica los cromosomas hijos
	caiT	-2.888	Transportador putativo
	<i>ydeF</i>		Transportador putativo
	<i>dsbE</i>		Tiorredoxina periplásmica de la biogénesis del citocromo tipo c
	yciS	-5.182	Proteína de membrana interna de la familia DUF1049, función desconocida
	<i>ybaT</i>		Supuesto transportador de aminoácidos
	<i>amtB</i>		Transportador de amonio
	<i>ftsW</i>		Anillo FtsZ
	creC	-3.815	Histidina quinasa sensorial en un sistema regulador de dos componentes con CreB o PhoB
	<i>fsr</i>		Supuesta proteína del sistema de eflujo de fosmidomicina
	<i>ynjF</i>		Proteína de membrana interna de la familia de fosfatidiltransferasa de alcohol CDP
	hyfE	-3.206	Hidrogenasa 4, subunidad de membrana
	<i>tolR</i>		Proteína que abarca la membrana en el complejo TolA-TolQ-TolR
	ydC	-3.500	Proteinasa de membrana
	<i>ynaC</i>		Profago Rac, supuesta proteína de ensamble de fibra
	b2973	-5.029	Lipoproteína de membrana interna predecida
	b1017	-3.085	Subunidad importadora de Fe (2+) pH bajo, fragmento C-terminal (pseudogen)
	yaeL	-2.945	metaloproteasa de zinc intermembrana
	b1192		LD-carboxipeptidasa A (síntesis de mureína)
	yabC	-3.994	Metiltransferasa dependiente de S-adenosil con actividad sobre sustratos asociados a membrana
	hemY	-4.090	hemY - proteína de síntesis de protohema IX predicha
	ycdP	-3.167	Proteína de membrana interna predicha
	b1758		Fosfatidil transferasa putativa, proteína de membrana interna
	yhiV	-3.501	Transportador multidrogas, dependiente de Rpo-S
	<i>hofG</i>		Sistema de secreción tipo II proteína GspG
	b2595		lipoproteína de membrana externa
Magnesio	ycaJ	-3.577	Factor de recombinación dependiente de ADN, la proteína RarA puede desempeñar un papel en la recombinación asociada con la replicación del ADN
	<i>ybaX</i>		7-ciano-7-deazaguanina (<i>preQ0</i>) sintasa; biosíntesis de queuosina
	<i>ftsK</i>		Translocasa de ADN en el anillo septal que clasifica los cromosomas hijos
	creC	-3.815	Histidina quinasa sensorial en un sistema regulador de dos componentes con CreB o PhoB
	b1199		Dihidroxiacetona quinasa, dominio C-terminal (<i>dhaL</i>)
	<i>cca</i>		ARNt nucleotidil transferasa fusionada / 2'3'-fosfodiesterasa cíclica / 2'nucleotidasa y fosfatasa

	<i>selD</i>		Selenofosfato sintasa
	upp	-2.839	Uracilo fosforibosiltransferasa
	<i>ygiH</i>		Proteína de membrana interna conservada
	yohG	-3.111	Proteína de membrana interna conservada
ATP (Unión)	<i>dnaJ</i>		chaperona Hsp40, DnaK co-chaperona
	upp	-2.83927	uracilo fosforibosiltransferasa
	<i>cca</i>		ARNt nucleotidil transferasa fusionada / 2'3'-fosfodiesterasa cíclica / 2'nucleotidasa y fosfatasa
	b1199		dihidroxiacetona quinasa, dominio C-terminal
	creC	-3.815	histidina quinasa sensorial en un sistema regulador de dos componentes con CreB o PhoB
	<i>ybaX</i>		7-ciano-7-deazaguanina (<i>preQ0</i>) sintasa; biosíntesis de queuosina
	<i>ftsK</i>		Translocasa de ADN en el anillo septal que clasifica los cromosomas hijos
	ycaJ	-3.577	Factor de recombinación asociado a replicación del ADN
	<i>yeaG</i>		Proteína conservada con dominio de hidrolasa de nucleósido trifosfato
	Metabolismo	ldcC	-3.580
yjhC		-3.764	Oxidorreductasa predicha, elemento parecido al fago KpLE2
b2736		-6.036	L-treonato deshidrogenasa putativa
b1725			Fosfotransferasa/quinasa predicha
b1771			Oxidorreductasa predicha
<i>yihU</i>			3-sulfolactaldehído reductasa
mhpD		-3.247	2-hidroxipentadienoato hidratasa
<i>lipA</i>			Lipoil sintasa
<i>serC</i>			Fosfoserina /fosfohidroxitreonina aminotransferasa
<i>ymfD</i>			Metiltransferasa pendiente de SAM predicha, e14 profago
Otros (Proteínas conservadas o predichas)	ymbA	-3.484	Proteína conservada
	<i>rpIN-r</i>		Proteína L14 subunidad 50S
	b0302		Proteína hipotética
	b1367		Proteína hipotética
	yhhM	-3.236	Proteína conservada
	<i>yagN</i>		Profago CP4-6, proteína predicha
	b2658		Proteína conservada
	b0959	-4.181	Proteína conservada
	b1904		Proteína predicha
	<i>yabP</i>		Proteína predicha
	<i>ycgB</i>		Proteína conservada
	<i>ygiR</i>		Proteína conservada
	<i>yhiK</i>		Proteína predicha (pseudogene)
	yahL	-6.502	Proteína predicha
	Ara7-15	-6.633	Proteína hipotética
	<i>yacH</i>		Proteína predicha
	<i>yjdI</i>		Proteína conservada
	b2654		Proteína predicha
	<i>agaA</i>		Proteína predicha
	yfbK	-4.461	Proteína conservada
	<i>rpsL</i>		Proteína S12 subunidad ribosomal 30S
	<i>yceP</i>		Proteína predicha
	<i>ycgY</i>		Proteína predicha
	<i>rpsJ</i>		Proteína S10 subunidad ribosomal 30S
	<i>yeeT</i>		Proteína predicha

	b2792	-2.817	Proteína conservada
	<i>ykgL</i>		Proteína predicha

12.3 Anexo 3. Categorización por anotación de los genes *Up* y *Down* regulados de la cepa BetR

Lista de Genes <i>Up</i> regulados BetR (después de doce días de desecación ambiental)			
Grupo por anotación	ID	Z-Score (2.0)	Función
Metabolismo (carbono, piruvato, glioxilato)	<i>map</i>		Metionina aminopeptidasa
	<i>yieK</i>		Supuesta glucosamina-6-fosfato desaminasa YieK
	<i>qor</i>		Quinona oxidoreductasa 1 putativa
	<i>nagD</i>		UMP fosfatasa
	<i>yfiQ</i>		Peptidil-lisina acetiltransferasa predecida
	<i>yjiL</i>		Supuesta ATPasa, activador de (R) -hidroxiglutaril-CoA deshidratasa
	<i>yieF</i>		Cromato reductasa clase I,
	<i>yjfP</i>		Carboxilesterasa
	<i>lacA</i>		Galactósido acetiltransferasa
	<i>ygF</i>		Oxidoreductasa predicha con dominio de unión a NAD(P)
	<i>slpA</i>	2.875	Peptidil-prolil cis-trans-isomerasa tipo FKBP (rotamasa)
	<i>gpsA</i>	3.238	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (NAD⁺)
	<i>yjcT</i>	2.967	D-alosa quinasa
	<i>lpxA</i>		UDP-N-acetilglucosamina acetiltransferasa
	<i>treA</i>		Trehalasa periplásmica
	<i>ddlB</i>		D-alanina:D-alanina ligasa
	<i>kdtA</i>		Transferasa del ácido 3-desoxi-D-manono-octulosónico (KDO transferasa) <i>waaA</i>
	<i>polA</i>		Polimerasa de ADN 5' a 3' y exonucleasa 3' a 5' / 5' a 3'
	<i>betA</i>		Flavoproteína, colina deshidrogenasa
	<i>speE</i>		Espermidina sintasa
	<i>pepN</i>		Aminopeptidasa
	<i>gsp</i>		Glutación espermidina sintasa
	<i>gcl</i>		Carboligasa de glioxilato
	<i>goaG</i>		4-aminobutirato transaminasa (<i>puuE</i>)
	<i>metC</i>		Cistationina beta-liasa dependiente de PLP
	<i>sgaU</i>		L-ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa, fosfopentosa epimerasa
	<i>ilvI</i>	3.1	Acetolactato sintasa isoforma 3 subunidad grande
	<i>ychB</i>		4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol quinasa
	<i>cysN</i>		Sulfato de adeniltransferasa subunidad 1
	<i>adhP</i>		Deshidrogenasa activa en etanol / reductasa activa en acetaldehído
	<i>ycdW</i>		Glioxilato/hidroxipiruvato reductasa A (<i>ghrA</i>)
	<i>sbm</i>	2.869	Metilmalonil-CoA mutasa
	<i>tktB</i>	2.878	Transcetolasa 2, unión a tiamina trifosfato

	<i>aceF</i>		Pituvato deshidrogenasa, componente E2 dihidrolipoil transacetilasa
	<i>accD</i>	3.087	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad beta (carboxil transferasa)
	<i>atoB</i>	3.009	Acetil-CoA-acetiltransferasa
	<i>yihS</i>		manosa isomerasa
	<i>yqeF</i>	3.625	aciltransferasa de cadena corta
Reparación ADN	b1759	3.704	Pirimidina (desoxi) nucleósido trifosfato pirofosfohidrolasa (<i>nudG</i>)
	<i>ykfG</i>		Profago CP4-6, Proteína YkfG que contiene el dominio JAB similar a RadC
	<i>umuC</i>	3.124	Subunidad de ADN polimerasa V propensa a errores
	<i>recR</i>		Proteína reparadora de huecos
	<i>rtcB</i>		Proteína conservada
	<i>polA</i>		ADN polimerasa I
	<i>yrfG</i>	3.848	Purina nucleotidasa
	<i>nfi</i>	3.005	Endonucleasa V
NAD ⁺ /FAD ⁺ (Oxidorreducción)	<i>chrR</i>		Cromato reductasa clase I, flavoproteína
	<i>ygfF</i>		Oxidorreductasa predicha con dominio de unión a NAD(P)
	<i>gor</i>		Glutión reductasa, unión FAD/NADP
	<i>ilvI</i>		Acetolactato sintasa isozima 3 subunidad grande
	<i>fixB</i>		Flavoproteína transportadora de electrones predicha, dominio de unión a NAD/FAD y dominio de unión a nucleótido adenina ETFP parecido
	<i>betA</i>		Deshidrogenasa de colina, flavoproteína
	<i>ndh</i>		NADH respiratoria deshidrogenasa 2 / reductasa cúprica
Transportadores ABC	<i>yhaO</i>		Transportador putativo
	<i>proY</i>		Permeasa específica de prolina
	b0832	4.098	Importador de Glutión, permeasa transportador ABC (<i>gsiD</i>)
	<i>ccmC</i>	2.958	Exportador de hemo ABC, componente de membrana
	<i>mIaB</i>		Transportador ABC para el mantenimiento de la asimetría de membrana externa, componente citoplasmático STAS
	b1442	2.837	Permeasa transportador ABC predicho
	<i>yhdX</i>		Permeasa putativa de aminoácidos, transportador ABC
	<i>proW</i>	2.933	Permeasa de glicina betaína/prolina, Transportador ABC
	<i>artQ</i>		Permeasa de arginina, transportador ABC
Recombinación ADN	<i>sodA</i>		Superóxido dismutasa, Mn
	b1432	3.11	IS609 transposasa B
	<i>accD</i>	3.087	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad beta (carboxiltransferasa)
	<i>yhhI</i>		Transposasa putativa
	<i>yahA</i>		Fosfodiesterasa específica de c-di-GMP, regulador transcripcional dual
	<i>polA</i>		ADN polimerasa I
	<i>lon</i>		Proteasa dependiente de ATP que se une al ADN
	<i>yidP</i>		Regulador transcripcional putativo (<i>yidP</i>) de la familia GntR que contiene el dominio UTRA
	<i>yfjN</i>		CP4-57 profagia; RNasa LS, toxina del sistema de toxina-antitoxina RnlAB
	<i>rstA</i>		Regulador de respuesta de unión al DNA del sistema de dos componentes RstAB
	<i>recR</i>		Proteína de recombinación y reparación de ADN
	<i>himD</i>		Factor de integración del huésped (IHF), proteína de unión al ADN, subunidad beta
	b1345		Rac profagia; integrasa (<i>intR</i>)
	<i>intD</i>	3.266	DLP12 profagia; supuesta integrasa de fagos

ATP (Unión o ATPasa)	<i>rtcB</i>		Ligasa de empalme de ARN
	<i>yfiQ</i>		Peptidil-lisina acetiltransferasa predicha
	<i>yjiL</i>		Supuesta ATPasa, activador de (R) -hidroxiglutaril-CoA deshidratasa
	<i>pka</i>		Proteína lisina acetiltransferasa
	<i>ycdT</i>	3.361	Diguanilato ciclasa anclada a membrana
	<i>ffh</i>	4.452	Componente de partícula de reconocimiento de señal (SRP) con ARN 4.5S
	<i>cysN</i>		Sulfato de adeniltransferasa, subunidad 1
	<i>ybcZ</i>		Histidina quinasa con detección de cobre en un sistema regulador de dos componentes con CusR
	<i>gsp</i>		Glutación espermidina sintetasa
	<i>accD</i>	3.087	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad beta (carboxiltransferasa)
	<i>ybdK</i>		Gamma-glutamil débil: cisteína ligasa
	<i>ygiC</i>	3.115	ATP-ATP familia ATPasa
	<i>pheT</i>		Fenilalanina tRNA sintetasa, subunidad beta
	b0829	4.098	Importador de Glutación, permeasa transportador ABC (<i>gsiD</i>)
	<i>lon</i>		Proteasa dependiente de ATP que se une al ADN
	<i>yjcT</i>	2.967	D-alosa quinasa
	<i>fhlA</i>		Activador transcripcional de formiato hidrogenilasa
	<i>ychB</i>		4-difosfocitidil-2-C-metileritritol quinasa
	<i>ybbA</i>		Componente de unión a ATP de un transportador de captación de metabolitos de la superfamilia ABC predicho
	<i>serS</i>		Serina-tRNA sintetasa
<i>ddlB</i>		D-alanina: D-alanina ligasa	
Proteínas de membrana	<i>m1aB</i>		Transportador ABC que mantiene la asimetría de lípidos OM, componente STAS citoplasmático
	<i>ybbA</i>		Componente de unión a ATP de un transportador de captación de metabolitos de la superfamilia ABC predicho
	<i>ygiB</i>		Proteína de membrana externa conservada
	<i>cmtB</i>		Supuesto componente de enzima IIA específica de manitol de PTS
	<i>fixB</i>		Supuesta flavoproteína que transfiere electrones, dominio de unión a NAD/FAD y proteína similar al dominio de unión a nucleótidos de adenina ETFP
	<i>yidP</i>		Regulador transcripcional putativo (<i>yidP</i>) de la familia GntR que contiene el dominio UTRA
	<i>ycdW</i>		Glioxilato/hidroxipiruvato reductasa A (<i>ghrA</i>)
	b1451		Supuesto transportador de membrana externa de hierro (<i>yncD</i>)
	<i>flu</i>		CP4-44 profagia; antígeno 43 (Ag43) autotransportador de formación de biopelícula variable de fase
	<i>betA</i>		Colina deshidrogenasa, una flavoproteína
	<i>nlpC</i>		Lipoproteína de peptidasa del clan C40 putativa
	b1806		Lipoproteína de la familia Slp, regulada por RpoE
	<i>ndh</i>		NADH deshidrogenasa 2 respiratoria / reductasa cúprica
	<i>yafY</i>		Lipoproteína, membrana interna; regulador de <i>degP</i> ; CP4-6 profagia
	<i>pepN</i>		Amino peptidasa N
	b0829	4.098	Transportador de Glutación tipo ABC (<i>gsiA</i>)
	<i>lpxP</i>		Aciltransferasa dependiente de la proteína portadora de palmitoleoil-acilo (ACP)
	<i>yjiN</i>		Proteína de membrana interna
	<i>ymfE</i>		e14 profagia; supuesta proteína de membrana interna
	<i>yhdV</i>		supuesta proteína de membrana externa
	b0832	4.098	Importador de Glutación, permeasa transportador ABC (<i>gsiD</i>)

	<i>kdtA</i>		3-desoxi-D-manono-octulosónico-ácido transferasa (KDO transferasa) <i>waaA</i>
	<i>yhdX</i>		Permeasa de aminoácidos putativa, transportador ABC
	<i>nagE</i>		Componentes de la enzima PTS específica de N-acetil glucosamina IIC, IIB y IIA
	<i>ftsN</i>		Proteína esencial de división celular
	<i>yiaH</i>		O-acetiltransferasa <i>predich</i>
	<i>artQ</i>		Permeasa de arginina, transportador ABC
	<i>proY</i>		Permeasa específica de prolina
	<i>ccmC</i>	2.958	Permeasa exportadora de hemo tipo transportador ABC, biosíntesis del citocromo C
	<i>murP</i>		Permeasa de ácido N-acetilmurámico, componente EIIBC, sistema PTS
	<i>amtB</i>		Transportador de amonio
	<i>ycdT</i>	3.361	Diguanilato ciclasa, anclada a membrana
	<i>yghQ</i>		Supuesta flipasa de polisacárido de membrana interna
	<i>lgt</i>	2.927	Fosfatidilglicerol-prolipoproteína diacilgliceril transferasa
	<i>cyoE</i>		Protohema IX farnesiltransferasa
	<i>yiaW</i>		Proteína de membrana interna de la familia DUF3302
	<i>ybcZ</i>		Histidina quinasa con detección de cobre en un sistema regulador de dos componentes con CusR
	<i>ymfA</i>		Proteína de membrana interna de la familia DUF3592
	<i>yhiV</i>		Transportador de flujo de salida de multidroga, regulado por ArcA (<i>mdtF</i>)
	<i>ynfM</i>	3.047	Supuesto transportador de eflujo de arabinosa
	<i>ydeA</i>	3.124	Transportador de eflujo de arabinosa, inducible por arabinosa
	<i>yhaO</i>		Transportador putativo
	<i>proW</i>	2.933	Permeasa de glicina betaína/prolina, transportador ABC
	<i>ytfT</i>		Supuesta permeasa de transportador ABC de azúcar
	b1442	2.837	Supuesta permeasa tipo transportador ABC
	<i>flgK</i>		Proteína de unión de gancho-filamento flagelar
	<i>flgD</i>		Biosíntesis flagelar, iniciación del ensamblaje del gancho
	<i>ydiC</i>		Proteína de inserción de clúster de azufre de hierro
	<i>yidY</i>		Proteína del sistema de eflujo multidroga (<i>mdtL</i>)
Reguladores transcripcionales	<i>lon</i>		Proteasa dependiente de ATP que se une al ADN
	<i>yjgJ</i>		Regulador transcripcional predicho
	<i>chpB-R</i>	3.736	Regulador antitoxina del sistema de toxina-antitoxina ChpB-ChpS
	b1432	3.11	IS609 transposasa B
	<i>polA</i>		DN polimerasa de 5 'a 3' y exonucleasa de 3 'a 5' / 5 'a 3'
	<i>yafM</i>		RAYT REP transposasa movilizadora de elementos; TnpA (REP)
	<i>yahA</i>		Fosfodiesterasa específica de c-di-GMP
	<i>ihfB</i>		Factor de integración al huésped (IHF), proteína de unión al ADN, subunidad beta
	<i>rstA</i>		Regulador de respuesta del sistema de dos componentes RstAB
	<i>bdcR</i>		Represor transcripcional para <i>bdcA</i> divergente
	<i>yidP</i>		Regulador transcripcional putativo de la familia GntR que contiene el dominio UTRA
	<i>ascG</i>	2.829	Represor del operón críptico (<i>ascFB</i>) cuyos genes están involucrados en el transporte y la utilización de los azúcares glucósidos arbutina, salicina y celobiosa
	<i>fhIA</i>		Activador transcripcional de formiato hidrogenilasa

	<i>soxS</i>		Activador transcripcional de la respuesta de regulón de superóxido; autorregulador
	<i>araC</i>		Activador transcripcional del regulón <i>ara</i> ; autorrepressor
	<i>rhaR</i>		Activador transcripcional de <i>rhaSR</i>
Transferasas piridoxal fosfato	<i>goaG</i>		4-aminobutirato transaminasa (<i>puuE</i>)
	<i>metC</i>		Cistationina beta-liasa dependiente de PLP
	b2253	2.883	Uridina 5´-(beta-1-treo-pentapiranosil-4-ulosa difosfato) aminotransferasa dependiente de PLP
Sistema de fosfotransferencia	<i>ydeA</i>	3.124	Transportador de salida de arabinosa, inducible por arabinosa
	<i>yjcT</i>	2.967	D-alosa quinasa
	<i>ispE</i>		4-difosfocitidil-2-C-metileritritol quinasa
	<i>ybcZ</i>		Histidina quinasa con detección de cobre en un sistema regulador de dos componentes con CusR
	<i>nagE</i>		Componentes del sistema PTS, enzima específica de N-acetil glucosamina IIC, IIB y IIA
	<i>cmtB</i>		Supuesto componente del sistema PTS, enzima IIA específica de manitol
	b2429		Permeasa de ácido N-acetilmurámico, componente EIIBC, sistema PTS (murP)
Hidrólisis de nucleótidos trifosfato	<i>cysN</i>		Sulfato de adeniltransferasa, subunidad 1
	<i>yjcT</i>	2.967	D-alosa quinasa
	<i>ispE</i>		4-difosfocitidil-2-C-metileritritol quinasa
	<i>ddlB</i>		D-alanina: D-alanina ligasa
	<i>serS</i>		Serina-tRNA sintetasa
	ffh	4.452	Componente de partícula de reconocimiento de señal (SRP) con ARN 4.5S (ffs)
	b0829	4.098	Importador de Glutación, permeasa transportador ABC (<i>gsiD</i>)
	<i>ybbA</i>		Componente de unión a ATP de un transportador de captación de metabolitos de la superfamilia ABC predicho
	<i>lon</i>		Proteasa dependiente de ATP que se une al ADN
<i>fhIA</i>		Activador transcripcional de formiato hidrogenilasa	
Lípidos	<i>nlpC</i>		Lipoproteína putativa, peptidasa clan C40
	b1806		Familia Slp, lipoproteína
	<i>yafY</i>		Lipoproteína de membrana interna
	<i>ddg</i>		Palmitoleoil aciltransferasa
	<i>yafK</i>		Proteína conservada
	b0609		Proteína hipotética
	<i>rpsK</i>		Proteína ribosómica S11 subunidad 30S
Otros (Proteínas conservadas o predichas)	b4286		proteína hipotética
	<i>yqiH</i>		Proteína hipotética, supuesta proteína fimbrial
	<i>yjbG</i>		Producción de exopolisacárido inducido por estrés osmótico
	b2970		Proteína predicha de vía secretoria
	b1836		Proteína hipotética
	yaiE	2.934	Proteína conservada
	<i>yahA</i>		Proteína hipotética
	<i>ftn</i>		Proteína de almacén de hierro (ferritina citoplasmática)
	b1583		Proteína conservada
	<i>yjhD</i>		Proteína hipotética
	b0165	4.072	Proteína hipotética
	b2863		Proteína conservada
	<i>ppdC</i>		Proteína predicha
	<i>yrbB</i>		Proteína predicha
<i>yrfA</i>		Proteína predicha	

	<i>yfaA</i>		Proteína Predicha
	<i>frr</i>		factor de reciclaje de ribosomas (gen esencial)
	b1423		Proteína conservada
	<i>ybaA</i>	3.399	Proteína conservada
	<i>yoaG</i>		Proteína predicha
	<i>ydeJ</i>		Proteína conservada
	<i>YdcC, Yhhl</i>	3.149	Proteína conservada
	<i>yggJ</i>		16S rRNA m (3) U1498 metiltransferasa (<i>rsmE</i>)
	<i>yfgA</i>	4.101	Proteína conservada

Lista de Genes <i>Down</i> regulados BetR (después de doce días de desecación ambiental)			
Grupo por anotación	ID	Z-Score (2.0)	Función
Síntesis de proteínas	<i>rplI</i>		Proteína L9 subunidad ribosómica 50S
	<i>rpsT</i>	-2.703	Proteína S20 subunidad ribosomal 30S
	<i>rpsC</i>		Proteína S3 subunidad ribosomal 30S
	<i>ykgM</i>		Proteína ribosomal predecida
	<i>smpB</i>	-2.674	La proteína B pequeña (SmpB) es un componente del proceso de traducción trans que marca las proteínas que se han estancado durante la traducción por degradación.
	<i>rhsA</i>	-2.988	Proteína del elemento rhs RhsA, afectación de la maquinaria de traducción
	<i>yafQ</i>		Toxina interferasa de ARNm dependiente de ribosomas. YafQ es homólogo a la toxina RelE, que inhibe la traducción como una endoribonucleasa de ARNm de secuencia específica.
Reguladores transcripcionales	<i>leuO</i>		factor de transcripción global
	<i>yabN</i>	-3.519	Regulador transcripcional dual de unión al ADN (<i>sgrR</i>)
	<i>ytfA</i>		Supuesto regulador transcripcional, reparación de ADN
	<i>emrR</i>	-2.597	Represor transcripcional de la síntesis de microcina B17 y eflujo multidrogas
	<i>nhaR</i>	-2.982	Activador transcripcional de <i>nhaA</i>, la activación por NhaR es responsable de la inducción osmótica de <i>osmC</i> (p1)
	<i>yafQ</i>		ARNm toxina interferasa del par toxina-antitoxina YafQ / DinJ
	<i>hspQ</i>		Proteína de choque térmico y de unión a ADN hemimetilado
	b1452	-4.049	Proteína de unión al ADN, Proteína que contiene un dominio similar a PQQ
	<i>uvrB</i>		Exinucleasa de reparación por escisión de nucleótidos, componente de reconocimiento de daño de ADN
	<i>ycdX</i>	-2.857	Fosfatasa alcalina
	<i>ygdP</i>		ARN pirofosfohidrolasa, degradación de ARN
<i>yccV</i>	-2.900	Proteína de choque térmico, proteína de unión al ADN hemimetilado	

	<i>ogt</i>		ADN metilado - [proteína] -cisteína S-metiltransferasa
	<i>tra8-1</i>	-3.329	IS30 transposasa
Componentes de membrana	<i>ompL</i>		Porina L de membrana externa; putativa sulfina lipídica
	<i>ygdI</i>		Lipoproteína verificada de la familia DUF903
	b1591		Proteína de unión al líder de gemelos-arginina para DmsA y TorA. Proteína de maduración de enzimas redox DmsD
	<i>dacC</i>		D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa; proteína de unión a penicilina 6a
	<i>pspA</i>	-2.618	Proteína reguladora para el operón de la proteína de choque-fago
	<i>ybgC</i>	-2.555	Acil-CoA tioéster hidrolasa
	<i>secG</i>		Translocasa de preproteína; subunidad de membrana
	<i>yshA</i>		Supuesta porina L de membrana externa
	<i>pgaD</i>		Biopelícula PGA sintasa PgaCD, subunidad reguladora; actividad estimulada por c-di-GMP y dimerización
	<i>hyfE</i>		Hidrogenasa 4, subunidad de membrana
	<i>ynjF</i>		Proteína de membrana interna de la familia CDP-alcohol fosfatidiltransferasa
	<i>osmC</i>		Peroxirredoxina osmóticamente inducible, proteína de membrana
	<i>ycdP</i>		Supuesta proteína de membrana interna
	b1758		Supuesta fosfatidil transferasa, proteína de membrana interna
	<i>hyfE</i>		Hidrogenasa 4, subunidad de membrana
	b1543		Transportador predicho
	<i>yeeT</i>	-2.511	Supuesto transportador de aminoácidos
<i>yciS</i>		Proteína de membrana interna con dos dominios transmembrana predichos	
<i>hofH</i>		Sistema de secreción tipo II proteína GspH	
Metabolismo	<i>ygfG</i>		Metilmalonil-CoA descarboxilasa. La metilmalonil-CoA descarboxilasa es una enzima independiente de la biotina que cataliza la descarboxilación de metilmalonil-CoA a propionil-CoA.
	<i>gjp</i>		Hidroxipiruvato isomerasa
	<i>yjhC</i>	-2.616	Elemento similar a fago KpLE2; supuesta oxidorreductasa YjhC
	<i>wecC</i>		UDP-N-acetil-D-manosamina deshidrogenasa
	<i>rbsD</i>		Supuesta proteína citoplasmática de unión a azúcar
	<i>ygaG</i>	-2.788	S-ribosilhomocisteína liasa (<i>luxS</i>) LuxS participa en la biosíntesis del autoinductor, la señal similar a la hormona que media la comunicación célula-célula durante la detección del quórum, la respuesta al aumento de la densidad celular.
	<i>ybaS</i>		Glutaminasa 1 podría contribuir a la resistencia a los ácidos
	<i>yiiL</i>		L-ramanosa mutarotasa
	<i>yajF</i>		Mano(fructo) quinasa
	<i>ybiY</i>		Supuesta enzima activadora de formato-liasa de piruvato YbiY
	<i>malP</i>	-2.687	Maltodextrina fosforilasa
<i>fixC</i>		Oxidorreductasa predicha, dominio de unión a FAD/NAD(P)	
Otros (Proteínas conservadas o predichas)	<i>ymcB</i>	-2.709	Proteína conservada
	<i>yhcG</i>	-3.062	Proteína hipotética
	<i>b0370</i>	-2.716	Proteína predicha
	<i>yggE</i>	-2.501	Proteína conservada
	<i>yhiS</i>		Proteína predicha
	<i>yqgB</i>		Proteína predicha
	<i>yccJ</i>		Proteína predicha
	<i>b2809</i>	-2.651	Proteína predicha
<i>yahL</i>		Proteína predicha	

	<i>sfmA</i>		Proteína adhesina predicha parecida a fimbrias
	<i>yjdl</i>		Proteína conservada
	<i>yceP</i>		Proteína predicha
	<i>yeeT</i>		Proteína predicha, pro-fago CP4-44
	b2792		Proteína conservada
	<i>yciO</i>		Proteína conservada