



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



INSTITUTO DE CIENCIAS (ICUAP)

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

**“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES
INVOLUCRADOS EN EL RETORNO DEL ESTADO VIABLE NO
CULTIVABLE DE *P. putida* KT2440 POSTERIOR A LA
REHIDRATACIÓN”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)**

PRESENTA:

M. C. LILIA ISELA LÓPEZ LARA

DIRECTORES:

D. C. ANTONINO BÁEZ ROGELIO

D. C. VERÓNICA QUINTERO HERNÁNDEZ

DICIEMBRE 2020

*A mis padres, hermanos y para el extraordinario Caleb
que nos llena de amor, alegría y esperanza cada día.*

AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento a mis directores de tesis al **Dr. Antonino Báez Rogelio** y la **Dra. Verónica Quintero Hernández**, por su respaldo, paciencia, disposición y sabiduría. Gracias al **Dr. Jesús Muñoz Rojas** por compartir sus conocimientos, brindar su apoyo y optimismo. A los tres, gracias infinitas por aceptarme en el grupo de laboratorio EMM y permitirme concluir el programa.

Gracias al comité tutorial, a la **Dra. Georgina Hernández Montes** por su valiosa ayuda y permitirme una breve estancia, a la **Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos** por sus atinadas observaciones y su disposición para la retroalimentación y al **Dr. Miguel Castañeda Lucio** por contribuir con sus invaluable observaciones y cuestionamientos en cada seminario y tutorial.

Gracias al comité revisor de tesis que contribuyo en la realización de este manuscrito, a la **Dra. Vianey Marín Cevada** por sus generosas y excelentes observaciones y al **Dr. Ricardo Carreño López** por su disposición y acertadas recomendaciones.

Agradezco también a la **Dra. Abisai** y al **Mtro. Lester** por su infinita ayuda para realización de este trabajo y por su valiosa amistad. Gracias a mis amigos del laboratorio EMM, a la **Dra. América, Maritza, Marysol, Raúl, Dany, Teo y Osvaldo** por compartir sus conocimientos, regalarme nuevas experiencias y charlas interminables.

Gracias a mis queridos amigos **Arturo** y **Elvia**, por estar presentes, por su apoyo en todos los momentos y por supuesto por su inigualable amistad, hacen los días más gratos. Igualmente, agradezco a **Elena, Marycruz, Areli, Cynthia, Saúl, Tony** y **Angeles** por su amistad, consejos y grandiosos momentos compartidos.

Gracias a mis padres, **Jovita** y **Pedro** por su apoyo e infinito amor, estaré eternamente agradecida por todo lo que me han dado, gracias también a mis hermanos **Lety** y **Pedro** por su apoyo incondicional y a mi sobrinito **Caleb** porque me motiva a ser mejor persona cada día.

Agradezco al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM) por aceptarme en el programa y a la coordinación por su ayuda a asistencia a cursos y congresos, mi agradecimiento a la **Sra. Ángeles** por su ayuda en todos los tramites. Agradezco a la Vicerrectoría de investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) y a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) por los financiamientos y becas otorgadas. Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca concedida para realización del programa de Doctorado.

Y sobre todo agradezco a **Dios** por la segunda oportunidad.

“La gratitud es la memoria del corazón”-Lao Tse



ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Bacterias benéficas	4
1.2 Estrés por desecación	5
1.3 Mecanismos de tolerancia a la desecación.....	7
1.4 Estado Viable no cultivable	9
II. ANTECEDENTES	11
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
IV. JUSTIFICACIÓN.....	13
V. HIPÓTESIS	13
VI. OBJETIVOS.....	14
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	15
6.1 Condiciones de crecimiento de <i>P. putida</i> KT2440 y sus mutantes	15
6.2 Ensayos de desecación-rehidratación utilizando <i>P. putida</i> KT2440 y sus mutantes.....	16
6.3 Microarreglos de <i>P. putida</i> KT2440 en condiciones de desecación-rehidratación	18
6.4 Análisis de expresión diferencial.....	22
6.5 Clasificación funcional por ontología y rutas metabólicas.....	22
6.6 Validación de genes diferencialmente expresados en <i>P. putida</i> KT2440 por RT-qPCR ...	23
6.7 Análisis del daño a membrana en células <i>P. putida</i> KT2440 y las cepas derivadas por microscopía de fluorescencia.....	26
VIII. RESULTADOS	28
7.1 Determinación de la supervivencia de <i>P. putida</i> KT2440 a desecación.....	28
7.2 Perfil transcriptómico de células desecadas-rehidratadas 20 minutos y células desecadas-rehidratadas 24 horas de <i>P. putida</i> KT2440.....	29
7.3 Genes diferencialmente expresados en células desecadas-rehidratadas 20 min	33
7.4 Validación de los genes diferencialmente expresados por RT-qPCR	34
7.5 Evaluación de la supervivencia a desecación de las mutantes de <i>P. putida</i> KT2440.....	37
7.6 Evaluación de la integridad de la membrana en las mutantes de <i>P. putida</i> KT2440	40
7.7 Genes diferencialmente expresados de células desecadas-rehidratadas 24 horas.....	42
7.8 Clasificación funcional de los genes diferencialmente expresados en la rehidratación de 24 horas.....	47



7.8.1 Genes sobreexpresados	47
7.8.2 Genes reprimidos	54
IX. DISCUSIÓN	56
X. CONCLUSIONES	67
XI. CONGRESOS, CURSOS Y PUBLICACIÓN	68
XII. REFERENCIAS	70
XIII. ANEXOS	82
Anexo 1: Contexto genómico de las mutantes de <i>P. putida</i> KT2440.....	82
Anexo 2: Extracción de DNA.....	83
Anexo 3: Amplificación del gen 16S.....	84
Anexo 4: Digestión del gen 16S.....	85
Anexo 5: Tinción con el kit LIVE/DEAD	86



ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AD	Antes de la desecación
BSR	Tasa de supervivencia bacteriana
DPID	Días después del inicio de la desecación
PGPB	Bacterias promotoras del crecimiento vegetal
ROS	Especies reactivas de oxígeno
TA	Temperatura ambiente
VBNC	Viable no cultivable



RESUMEN

En el presente estudio se exploró la supervivencia de *Pseudomonas putida* KT2440 a la desecación ambiental y su posterior rehidratación. Se encontró que es una bacteria poco tolerante a desecación, debido a que 15 días después del inicio de la desecación pierde la viabilidad. Anteriormente, se estableció que *P. putida* KT2440 entra en estado viable no cultivable (VBNC) como estrategia de supervivencia a la desecación y recupera la viabilidad cuando las células son rehidratadas por un periodo de 24 horas. El análisis transcriptómico de células desecadas 18 días y rehidratadas 20 minutos y células desecadas 18 días y rehidratadas 24 horas comparado con células no desecadas reveló genes potencialmente involucrados en el retorno del estado VBNC. Se determinó que la activación de los procesos de transporte, a través del receptor dependiente de TonB (PP_1446) para la captación de sideróforos y el sistema de transporte de alcoholes de cadena media (PP_2662 y PP_2676) contribuyen a ciertas funciones en el estado VBNC de *P. putida* KT2440. No obstante, la interrupción del gen PP_1446 incrementó la supervivencia de la cepa mutante. Además, se encontró que la mayor expresión de transcritos fue detectada durante la rehidratación por 24 horas, 148 genes fueron regulados positivamente y 43 genes fueron regulados negativamente. De acuerdo con la clasificación funcional correspondiente a procesos biológicos se estableció que los procesos enriquecidos fueron transporte, óxido-reducción, regulación de la transcripción y procesos biosintéticos, para los genes inducidos. Los resultados sugieren la activación del catabolismo de fenilalanina y leucina, para la obtención de fuentes de carbono y nitrógeno durante la limitación de nutrientes que impera en las condiciones de rehidratación, además de la activación de biosíntesis de aminoácidos posiblemente para la acumulación de solutos compatibles. Para los genes reprimidos el proceso mayormente afectado fue el proceso de traducción, indicando que la síntesis de proteínas se reduce.



ABSTRACT

In the present study, the survival of *Pseudomonas putida* KT2440 to air desiccation and rehydration was evaluated, we found that KT2440 is a desiccation-sensitive bacterium, after 15 days of desiccation, this bacterium loses cultivability. Previously, we showed that *P. putida* KT2440 can develop a viable non-culturable state (VBNC) as a survival strategy to deal with desiccation stress. When dormant cells are rehydrated for 24 hours they recover cultivability. The transcriptomic analysis of cells desiccated-rehydrated for 20 minutes and cells desiccated-rehydrated for 24 hours compared to non-desiccated cells, revealed genes potentially involved in the return of the VBNC state. The activation of transport processes, through the TonB-dependent receptor (PP_1446) and medium chain alcohol transport system (PP_2662 and PP_2676) suggested that the uptake of siderophores and medium chain alcohol metabolism contribute to certain functions in the VBNC state of *P. putida* KT2440. The downregulation of ribosomal protein genes indicated that protein synthesis was reduced in the VBNC state. The interruption of the PP_1446 gene increased the survival of this mutant strain. Finally, the highest expression of transcripts was detected during rehydration for 24 hours, 148 genes were positively regulated, and 43 genes were negatively regulated. According to the functional classification corresponding to biological processes, the enriched processes were transport, oxide-reduction, regulation of transcription and biosynthetic processes, for the induced genes. These results included the activation of phenylalanine and leucine catabolism pathways, suggesting that cells obtain carbon and nitrogen sources from those amino acids.



I. INTRODUCCIÓN

El suelo es parte importante del ecosistema terrestre y esencial para el sustento de numerosos procesos de la vida (Tilak *et al.*, 2005). La microbiota que habita en el suelo le provee fertilidad y de esta forma contribuye al éxito de los cultivos agrícolas (Wang *et al.*, 2020). Bacterias, hongos, actinomicetos, protozoos y algas componen la microbiota del suelo, siendo las bacterias el grupo más abundante, comprendiendo cerca del 95% de los microorganismos (Glick, 2012). En el suelo habitan alrededor de 10^8 a 10^9 células microbianas por cada gramo y millones de especies diferentes (Glick, 2012; Tkacz *et al.*, 2020). La microbiota se encuentra en constante interacción con las raíces de las plantas, a esta área se le conoce como rizósfera y es la región donde las raíces de las plantas, el suelo y la microbiota interactúan entre sí (Lynch, 2002). Las raíces en la rizósfera influyen y promueven la interacción bacteria-planta, puesto que las raíces son capaces de liberar gran variedad de compuestos presentes en los exudados (azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y otras moléculas pequeñas) (Kamilova *et al.*, 2006), los cuales realizan la atracción de organismos benéficos, neutrales y patógenos (de Souza *et al.*, 2015). Los microorganismos benéficos contribuyen a incrementar la productividad de la planta a través de diferentes mecanismos (Tilak *et al.*, 2005), por ejemplo, facilitando y modulando los niveles de hormonas, inhibiendo agentes patógenos y actuando como rizadorremediadores (Olanrewaju *et al.*, 2017).

Con el fin de encontrar nuevas alternativas y disminuir el uso de fertilizantes químicos, se ha estudiado el uso de microorganismos para la formulación de inoculantes bacterianos, por la capacidad de influenciar el desarrollo de las plantas y disminuir la contaminación y deterioro de los suelos (Tilak *et al.*, 2005). Los inoculantes bacterianos son productos comerciales formados por uno o más microorganismos que ejercen un efecto positivo en las plantas (Bashan and Holguin, 1998). Las bacterias promotoras del crecimiento de plantas ó PGPB (por las siglas en inglés de: plant growth promoting bacteria) son parte de las formulaciones de inoculantes, sin embargo, el diseño de estos depende de la capacidad de promoción del crecimiento, la capacidad de colonización y

adhesión a las plantas y semillas, la interacción entre las cepas y la adaptación a diferentes ambientes (Molina-Romero *et al.*, 2017).

1.1 Bacterias benéficas

Las bacterias promotoras de crecimiento de plantas constituyen un grupo de bacterias de diversos géneros que por medio de varios mecanismos mejoran el crecimiento y rendimiento de las plantas (Ahemad *et al.*, 2014).

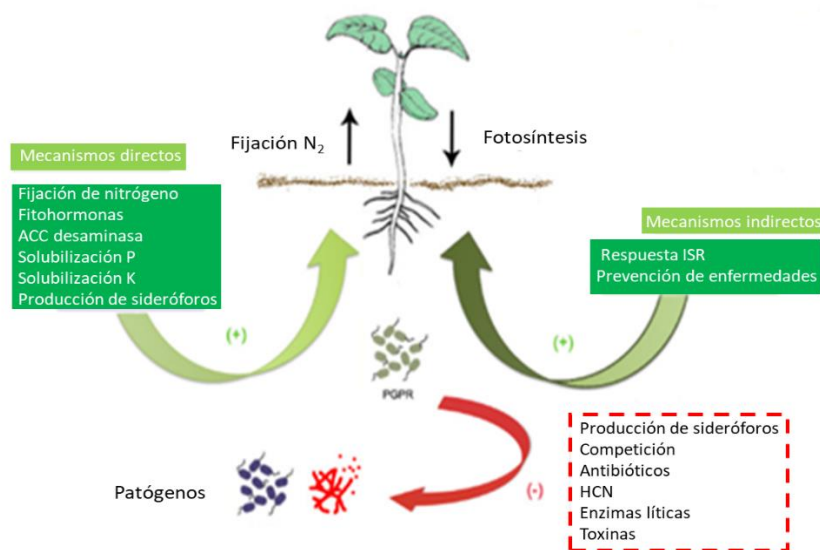


Figura 1. Mecanismos de acción de las PGPB (imagen tomada y modificada de García-Fraile *et al.*, 2015).

Las PGPB se asocian a las plantas a través de la colonización intracelular o extracelular, permaneciendo al interior de las raíces o en la rizósfera, respectivamente. Dentro de las funciones benéficas propias de las PGPR se encuentra, la actividad como biofertilizante, fitoestimulante, rizadorremediador y biopesticida. Los mecanismos que emplean para llevar a cabo sus funciones se clasifican de acuerdo a su actividad directa o indirecta (Figura 1) (Ahemad *et al.*, 2014; García-Fraile *et al.*, 2015). Los mecanismos acción directos incluyen la fijación biológica de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de fitohormonas y producción de sideróforos. Por otro lado, los mecanismos indirectos con efecto benéfico son la producción de antibióticos, enzimas líticas, producción de



compuestos orgánicos volátiles y la resistencia sistémica inducida (Ahemad and Kibret 2014; Figueiredo *et al.*, 2016; Kloepper *et al.*, 1989).

1.2 Estrés por desecación

El estrés por factores abióticos tales como, la temperatura, pH, salinidad y la desecación afectan a las comunidades microbianas del suelo y causan pérdida de la productividad agrícola, sobre todo cuando las bacterias promueven el crecimiento de plantas (Molina-Romero *et al.*, 2017; Raza and Faisal, 2013). El contenido de agua en el suelo es uno de los factores más limitantes de la actividad microbiana y tiene un efecto importante en la viabilidad y supervivencia de los microorganismos (Potts, 2001; Uhlířová *et al.*, 2005). El agua es necesaria para muchos procesos biomoleculares tales como el plegamiento y estabilidad de proteínas, ADN y lípidos, así como mantener la estructura celular (Lebre *et al.*, 2017; Potts, 1994).

La limitación de agua impide el funcionamiento celular y la supervivencia, esta condición se debe al estrés por desecación o el aumento de la concentración de solutos (hipertonicidad). Las bacterias responden a la deficiencia de agua desencadenando diversas respuestas que propician estrés bioquímico, físico, metabólico y fisiológico (Figura 2) (Lebre *et al.*, 2017; Potts, 1994).

La desecación provoca cambios a nivel físico, tal es el caso, de la contracción de membrana celular, la reducción de la superficie celular, disminución de la presión de turgencia y la reducción del volumen citoplasmático (Lebre *et al.*, 2017; Van De Mortel, 2004). Estos efectos fisiológicos son producto de la transición de fase de la membrana debida a la ruptura de puentes de hidrógeno, cambios en la distribución de los lípidos en la membrana y la desnaturalización de proteínas, todo ello comprometiendo a la integridad de la membrana (Potts, 1994; Scherber *et al.*, 2009) Los daños a la membrana celular afectan el transporte de metabolitos alterando la cinética de algunas vías metabólicas, provocando un estrés metabólico (Potts, 1994). Además, se producen daños provocados por el desbalance bioquímico como lo es la desnaturalización de proteínas y afectando a la actividad enzimática de algunas rutas metabólicas, ejemplo

de ello es la interrupción de la cadena respiratoria promoviendo la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y aumentando el estrés oxidativo. Además, se producen modificaciones químicas del ADN (oxidación y alquilación) y deficiencia de las vías de protección y reparación del ADN (Lebre *et al.*, 2017; Potts, 1994). La muerte celular ocurre en aquellas bacterias que no son capaces de mitigar el daño provocado por la desecación (Alpert, 2005).

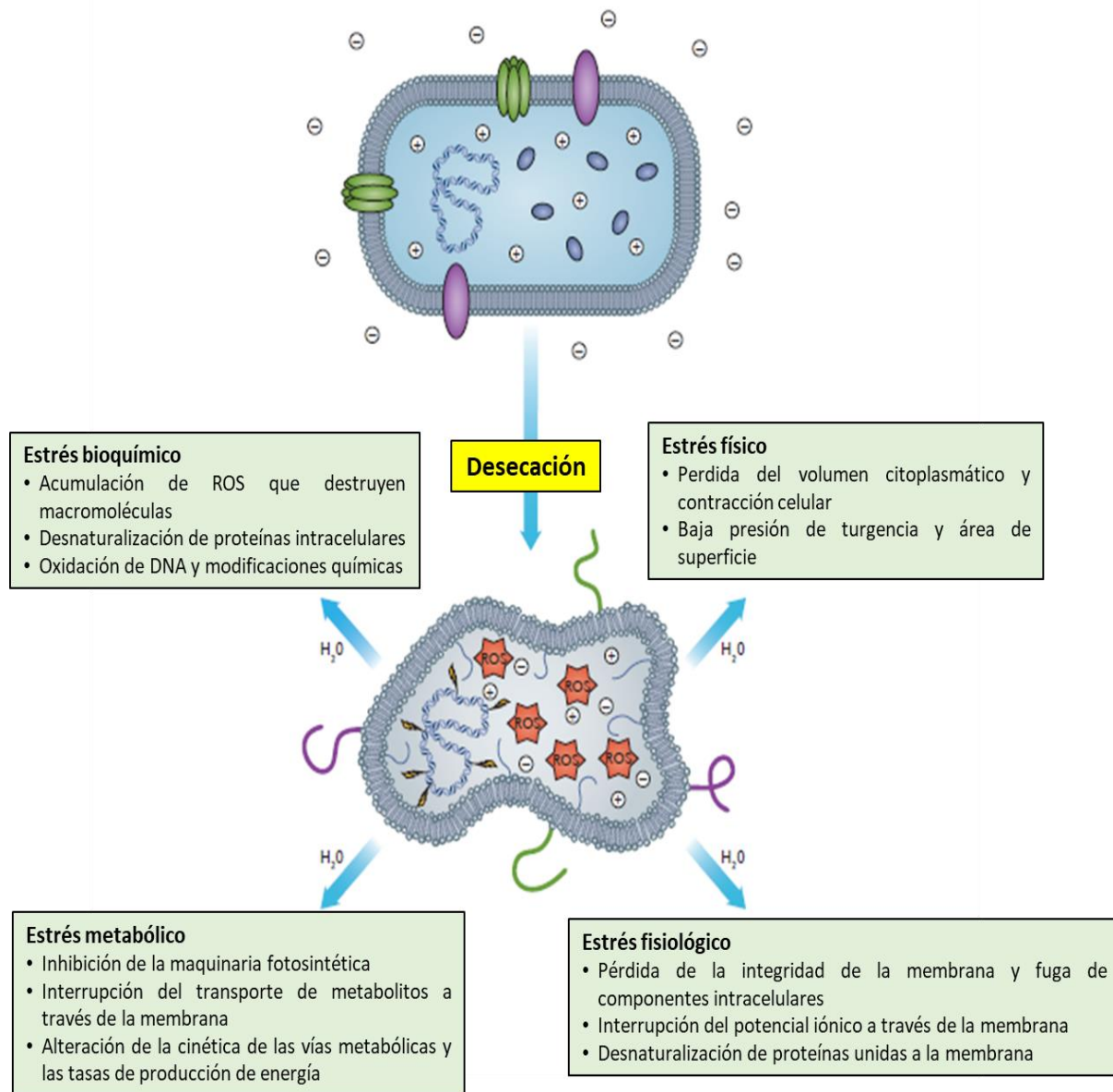


Figura 2. Efectos de la desecación sobre la célula (imagen tomada y modificada de Lebre *et al.*, 2017).

1.3 Mecanismos de tolerancia a la desecación

La tolerancia a la desecación o anhidrobiosis (vida sin agua), es el proceso por el cual un organismo metabólicamente activo, entra en estado de cese de sus funciones cuando se remueve completamente el agua extra e intracelular, estos organismos tienen la habilidad de entrar en un estado suspendido hasta su posterior rehidratación, en ese momento reestablecen su actividad previa al proceso de desecación (Figura 3) (Alpert, 2005; Potts, 1994).

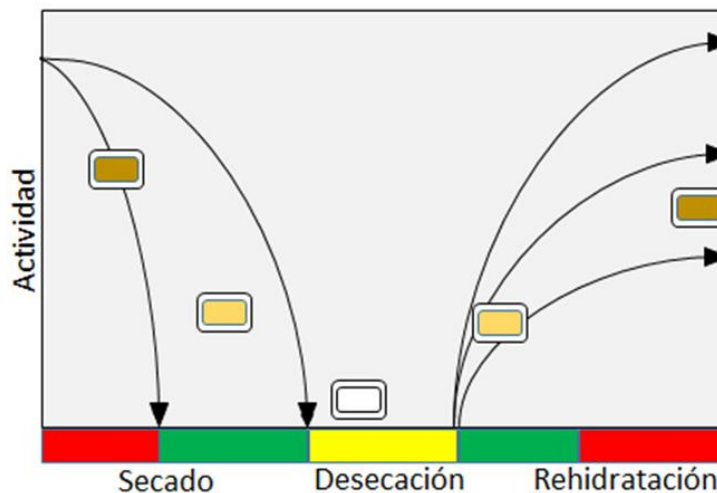


Figura 3. Proceso de desecación-rehidratación de una bacteria, representa los cambios de actividad celular con respecto al estado de hidratación (imagen tomada y modificada de Potts, 1994).

La definición cuantitativa de tolerancia a la desecación es cuando la bacteria sobrevive a la pérdida de agua a un nivel igual o inferior de 0.1 g de agua por gramo de masa seca (10% de contenido de agua) (Alpert, 2005). En contraste, las bacterias sensibles no son capaces de sobrevivir cuando el agua contenida en la célula es reducida a 0.3 H₂O g⁻¹ de masa seca (Alpert, 2005; Billi and Potts, 2002).

Las células bacterianas que son tolerantes a la desecación tienen diversos mecanismos para sobrellevar los daños provocados por el estrés (Figura 4). En algunas bacterias se ha observado que hay un aumento en la biosíntesis de exopolisacáridos (EPS), se propone que tiene la función de actuar como un agente de unión para las moléculas de agua ofreciendo un microambiente hidratado (Gülez *et al.*, 2014; Roberson and

Firestone, 1992). Las mutaciones en la vía de síntesis de EPS disminuyen la tolerancia a la desecación (Ophir & Gutnick, 1994).

La modificación de la composición de la membrana es otro mecanismo por el cual la bacteria es capaz de tolerar la disminución extrema de agua, se ha observado un aumento de lípidos saturados y la isomerización *cis-trans*. La proporción de lípidos de membrana se modifica con la finalidad de preservar la fluidez y mantener la fase cristal líquido, el estado fluido de la membrana permite la permeabilidad, transporte y traducción de señales, durante la desecación (Lebre *et al.*, 2017).

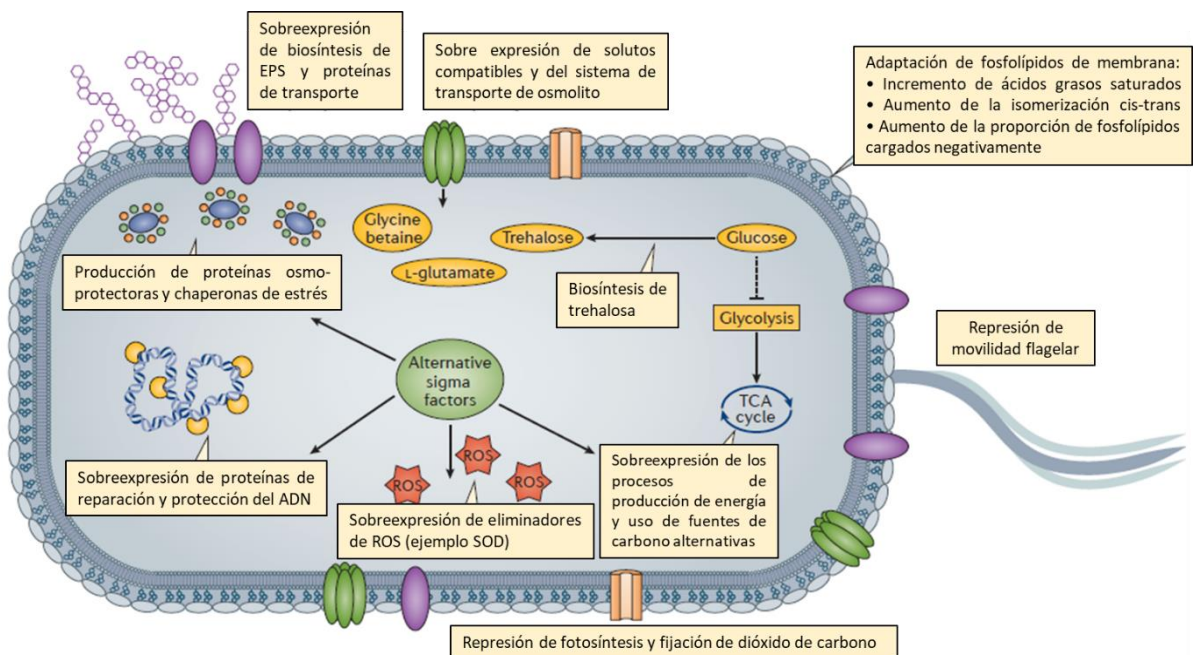


Figura 4. Mecanismos de tolerancia a la desecación (imagen tomada y modificada de Lebre *et al.*, 2017).

Una estrategia de resistencia a la desecación es la acumulación intracelular de moléculas de bajo peso molecular y sales, las cuales ayudan a mantener el equilibrio osmótico, la fluidez de la membrana y las proteínas en su forma hidratada (Van De Mortel and Halverson 2004; Zhang and Yan 2012). Hay una gran variedad de solutos compatibles, algunos ejemplos son: carbohidratos (trehalosa, glicerol y sacarosa), aminoácidos (prolina y glutamato) y compuestos como la betaina y sus análogos. Estos solutos son adquiridos del ambiente o sintetizados *de novo* por la bacteria (Gouffi *et al.*, 1998). Bajo



estas condiciones los sistemas de transporte de osmolitos, iones y solutos orgánicos se sobreexpresan en respuesta al estrés para contrarrestar la deshidratación (Lebre *et al.*, 2017; Purvis *et al.*, 2005).

Durante la desecación aumenta la expresión de proteínas de estrés denominadas *heat shock proteins* (HSP), son chaperonas que cumplen la función de ser ensambladoras y plegadoras, también participan en la secreción y degradación de proteínas (Feder and Hofmann, 1999). Las aquaporinas son proteínas que tienen la función de regular el transporte de osmoprotectores que impiden la lisis celular, son parte de la primera respuesta ante el estrés por desecación (Esbelin *et al.*, 2018).

Para contrarrestar la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) se sobreexpresan enzimas que disminuyen la acumulación por medio de superóxido dismutasa (SOD), catalasas y tioredoxinas (Lebre *et al.*, 2017). El daño al ADN ocasionado principalmente por la acumulación de ROS es impedido por las proteínas de unión a ADN y corregido por las proteínas reparadoras de ADN, aumentan su expresión en condiciones de estrés por desecación (Cytryn *et al.*, 2007; Lebre *et al.*, 2017; Mattimore and Battista 1996).

Otro mecanismo que se activa bajo diferentes condiciones de estrés (radiación y desecación) es la inducción del metabolismo central del carbono, de tal forma que algunas enzimas que participan en la glucólisis, el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) y el ciclo del glioxilato se sobreexpresan para mantener el estado energético de la célula (Minic, 2015).

1.4 Estado Viable no cultivable

Las bacterias responden a las condiciones adversas ambientales (desecación, hambruna, antibióticos, temperatura, entre otros) empleando diversos mecanismos de supervivencia (L. Li, Mendis, Trigui, Oliver, & Faucher, 2014). Algunas bacterias son capaces de disminuir la actividad metabólica y entrar a un estado viable no cultivable (VBNC; del inglés: Viable but nonculturable) (Babu *et al.*, 2014; Heim *et al.*, 2002). Este



estado se caracteriza por la pérdida de la capacidad de crecimiento en medios convencionales, sin perder la viabilidad dado que las células conservan la integridad de la membrana celular, la expresión de genes, la síntesis de proteínas y de otras macromoléculas, bajo una actividad metabólica disminuida (Heim *et al.*, 2002; Ayrapetyan *et al.*, 2018; Rowe and Madden 2014). El estado es reversible (resucitación) posterior a un tratamiento o la mejora de las condiciones ambientales, por lo que sus funciones retornan y la división celular se reestablece (Babu *et al.*, 2014; Heim *et al.*, 2002). Se ha reportado que aproximadamente cien especies de microorganismos, entre ellos bacterias y hongos utilizan el estado VBNC como mecanismo de tolerancia a diversos estreses y a medida que surgen nuevos avances tecnológicos es posible determinar nuevos microorganismos (Dong *et al.*, 2020) . Los mecanismos que se activan durante el estado VBNC y el retorno del estado o resucitación dependen de cada microorganismo, aún no se conoce con exactitud los genes específicos involucrados y las condiciones por las cuales se induce.



II. ANTECEDENTES

Pseudomonas putida KT2440 es una bacteria Gram-negativa saprofita, se encuentra clasificada en el grupo de las gamma-proteobacterias. Es ubicua pues posee la capacidad de habitar diversos ambientes debido a su versatilidad metabólica (Molina *et al.*, 2000). La cepa de *P. putida* KT2440 es derivada de la cepa *P. putida* mt-2. Esta última es capaz de degradar tolueno, ya que posee el plásmido TOL-pWW0 que codifica para las enzimas necesarias para su degradación (Franklin *et al.*, 1981; Molina *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 2002).

El genoma de *P. putida* KT2440 fue secuenciado por (Nelson *et al.*, 2002), tiene una longitud de 6 Mbp con un contenido de 61.6% GC y un total de 5420 marcos de lectura abierta (ORFs) (Molina-Henares *et al.*, 2010; Nelson *et al.*, 2002). Se encuentra certificada por el comité asesor de investigación en ADN recombinante RAC (por las siglas en inglés: Recombinant DNA Advisory Committee) como cepa biosegura y puede ser utilizada como cepa hospedera para clonación y expresión de genes de bacterias del suelo (Nelson *et al.*, 2002).

P. putida KT2440 es parte de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, se ha reportado que tiene la capacidad de colonizar las raíces de un gran número de plantas, entre ellas; maíz, trigo, fresa, caña de azúcar y espinacas (Espinosa-Urgel *et al.*, 2002; Dos Santos *et al.*, 2004). Además, su importancia agrobiotecnológica recae en la habilidad para degradar compuestos xenobióticos, siendo de interés para propósitos de biocontrol y biorremediación (M. A. Molina *et al.*, 2005; Nelson *et al.*, 2002).

P. putida KT2440 ha sido ampliamente estudiada con fines biotecnológicos por las características anteriormente mencionadas, sin embargo, se ha reportado que la supervivencia de *P. putida* KT2440 disminuye en condiciones de desecación y condiciona su uso en la formulación de inoculantes (Molina-Romero *et al.*, 2017; Pazos-Rojas *et al.*, 2019). Es una bacteria poco tolerante a la desecación ambiental (Figura 5) (Pazos-rojas *et al.*, 2018) y liofilización (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006). Se ha descrito que la

supervivencia de *P. putida* KT2440 mejora cuando es sometida a desecación con azúcares y polialcoholes como protectores, mismos que le confieren la tolerancia a la desecación (Muñoz-Arenas, 2011). Los disacáridos no reductores como la trehalosa permiten mejorar la tolerancia aumentando la viabilidad de *P. putida* KT2440 18 DPID y optimizando la adhesión a semillas de maíz (Pazos-rojas, 2019). Asimismo, se ha encontrado que cuando la cepa de *P. putida* KT2440 y *Klebsiella variicola* T29A2 (cepa resistente a la desecación) son cultivadas juntas y sometidas al proceso de desecación-rehidratación, la supervivencia de *P. putida* KT2440 se incrementa, sugiriendo así que la co-interacción le confiere mayor capacidad para tolerar el estrés, a diferencia de cuando la cepa se sometida al estrés sola (Hernández-Canseco, 2015).

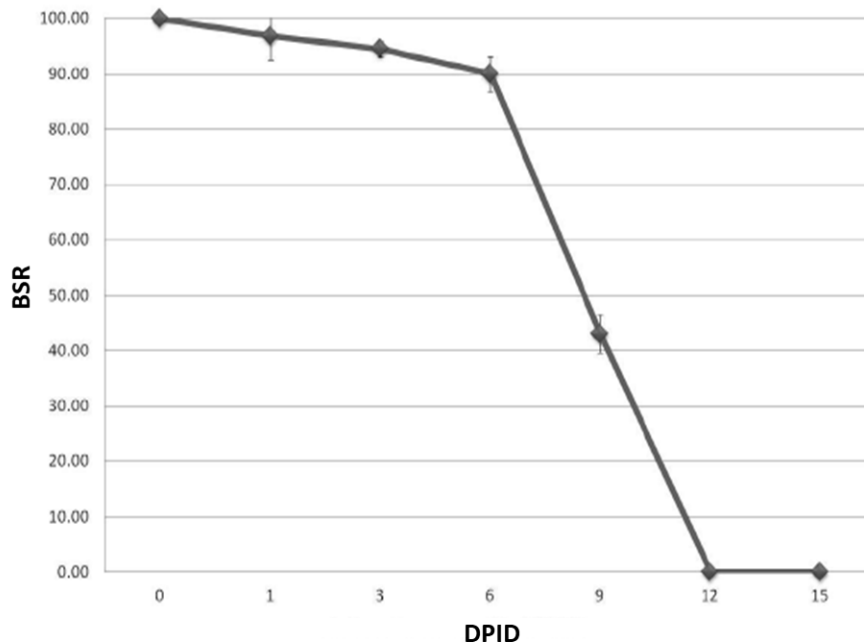


Figura 5. Tasa de supervivencia de *P. putida* KT2440 (BSR) durante la desecación 30 °C, 50% humedad relativa (Pazos-rojas, 2011).

Por otra parte, en ensayos de desecación durante 18 días con posterior rehidratación de 20 minutos en agua destilada estéril, *P. putida* KT2440 no fue detectada en placa, sin embargo, al incrementar el tiempo de rehidratación durante 24 horas se logró detectar colonias en placa, sugiriendo así que la bacteria entra en estado VBNC como estrategia de supervivencia (Pazos-Rojas et al., 2019; Pazos-rojas et al., 2018).



III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En nuestro grupo de trabajo “Laboratorio de ecología molecular y microbiana” se ha encontrado que *P. putida* KT2440 cuando es sometida a desecación pierde la capacidad de crecer en placa, sin embargo, cuando las células desecadas son rehidratadas por un largo periodo de tiempo (mayor a 24 horas), éstas recuperan su cultivabilidad, lo cual ha sugerido que *P. putida* KT2440 utiliza el estado de dormancia o VBNC como una estrategia de supervivencia al estrés por desecación. Los mecanismos que emplea la bacteria para llevar a cabo estos cambios son desconocidos, así que, el determinar los genes que gobiernan el estado VBNC es de suma importancia para comprender la estrategia de supervivencia utilizada por *P. putida* KT2440.

IV. JUSTIFICACIÓN

La productividad agrícola se ha visto beneficiada por la introducción de los inoculantes microbianos y por la disminución del uso de químicos que provocan daños en el suelo y ambiente. Sin embargo, un aspecto esencial para el éxito de los inoculantes que promueven el crecimiento vegetal radica en la capacidad de los microorganismos que lo conforman para sobrevivir a condiciones adversas, como lo es la limitación de agua. Estos microorganismos emplean diversas estrategias para mantener su viabilidad aún en condiciones de poca disponibilidad de agua. *P. putida* KT2440 utiliza el estado VBNC como mecanismo de supervivencia a la desecación ambiental, sin embargo, el proceso ha sido poco estudiado. En el presente estudio se analizará el perfil transcriptómico de *P. putida* KT2440 posterior al proceso de desecación-rehidratación con la finalidad de determinar los genes potencialmente involucrados en el retorno del estado VBNC.

V. HIPÓTESIS

El retorno del estado VBNC de *P. putida* KT2440 posterior a la rehidratación presentará una expresión diferencial de genes.



VI. OBJETIVOS

Objetivo general:

Identificar los genes involucrados en el retorno del estado VBNC en células desecadas-rehidratadas de *P. putida* KT2440.

Objetivos particulares:

- Determinar los genes diferencialmente expresados en *P. putida* KT2440 en el proceso de desecación-rehidratación 20 minutos (Corta).
- Analizar la expresión diferencial de *P. putida* KT2440 durante la desecación-rehidratación 24 horas (Prolongada).
- Evaluar el comportamiento de *P. putida* KT2440 y sus cepas derivadas durante el proceso de desecación-rehidratación 20 minutos y desecación-rehidratación 24 horas.
- Determinar los genes involucrados en el retorno del estado VBNC.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Condiciones de crecimiento de *P. putida* KT2440 y sus mutantes

En el presente estudio se utilizó la cepa de *P. putida* KT2440 (Tabla 1), se creció en medio Luria-Bertani (LB) complementado con cloranfenicol 100 µg/mL (LB-Cm¹⁰⁰) a 30 °C en agitación constante.

Las mutantes derivadas de *P. putida* KT2440 analizadas en este estudio fueron donadas por el Consejo superior de investigaciones científicas, Estación Experimental del Zaidín (CSIC-EEZ) (Tabla 1). La colección de mutantes se construyó por mutagénesis al azar utilizando el transposón miniTn5 (Km), la inserción del transposón se identificó por PCRs arbitrarias. La información de cada mutante que conforma la colección se encuentra en la base de datos *Pseudomonas* reference culture collection (<http://artemisa.eez.csic.es/mutantes>) ver Anexo 1.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio.

Cepa	Descripción	Referencia
<i>P. putida</i> KT2440	Cepa tipo	(Molina-Romero <i>et al.</i> , 2017; Pazos-Rojas <i>et al.</i> , 2019)
ΔPP_0256	Derivada de <i>P. putida</i> KT2440 PP0256::km ^R	Cepa donada por EEZ (Molina-Henares <i>et al.</i> , 2010; <i>Pseudomonas</i> reference culture collection)
ΔPP_0880	Derivada de <i>P. putida</i> KT2440 PP0880::km ^R	Cepa donada por EEZ (<i>Pseudomonas</i> reference culture collection EEZ) (Molina-Henares <i>et al.</i> , 2010; <i>Pseudomonas</i> reference culture collection)
ΔPP_1446	Derivada de <i>P. putida</i> KT2440 PP1446::km ^R	Cepa donada por EEZ (Molina-Henares <i>et al.</i> , 2010; <i>Pseudomonas</i> reference culture collection)
ΔPP_3451	Derivada de <i>P. putida</i> KT2440 PP3451::km ^R	Cepa donada por EEZ (Molina-Henares <i>et al.</i> , 2010; <i>Pseudomonas</i> reference culture collection)

Las mutantes crecieron en medio LB suplementado con 100 µg/mL de cloranfenicol y 50 µg/mL de kanamicina. Las cepas se identificaron por métodos moleculares, se extrajo DNA (Anexo 2) y se amplificó el gen que codifica para el ARNr 16S (Anexo 3).



Posteriormente se llevó a cabo la restricción del amplificado y se observó el patrón de bandas en un gel de agarosa 3% (Anexo 4).

6.2 Ensayos de desecación-rehidratación utilizando *P. putida* KT2440 y sus mutantes

Se llevaron a cabo ensayos de desecación-rehidratación con *P. putida* KT2440 y se determinó su supervivencia bajo estas condiciones, el procedimiento se muestra en la figura 6. El preinóculo de *P. putida* KT2440 fue incubado en medio LB-Cm¹⁰⁰ a 30 °C con agitación constante durante toda la noche. Posteriormente, se inoculó un matraz con 50 mL de LB-Cm¹⁰⁰ ajustando la densidad óptica inicial a 0.01 (D.O.₆₀₀), se incubó a 30 °C y agitación constante hasta llegar a la fase estacionaria (D.O.₆₀₀ 4-4.5). El cultivo se centrifugó a 6000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en agua destilada estéril al volumen inicial (50mL) y se centrifugó nuevamente, el lavado se realizó dos veces más. El último lavado se empleó para preparar alícuotas de 500 µL de la suspensión en microtubos de 1.5 mL, estos fueron sellados con tapones de algodón estéril. Las alícuotas se llevaron a una cámara de desecación controlada a 30 °C y 50% de humedad relativa por 18 días. Se utilizaron tres alícuotas para realizar el conteo de unidades formadoras de colonia UFC/mL antes del inicio de la desecación utilizando la técnica de goteo en placa en medio LB-Cm¹⁰⁰. Cada tercer día después del inicio de la desecación (DPID) se retiraron de la cámara de desecación 3 alícuotas y se rehidrataron con 500 µL agua destilada estéril durante 20 minutos, se determinó el número de UFC/mL y la tasa de supervivencia bacteriana (BSR) hasta el día 18.

La tasa de supervivencia bacteriana (BSR) se determinó por medio de los conteos de UFC/mL antes y después del proceso de desecación-rehidratación de acuerdo a la siguiente fórmula (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006):

$$BSR = \frac{\text{Log}(\text{UFC/mL DPID} + 1)}{\text{Log}(\text{UFC/mL AD})} \times 100$$

BSR: Tasa de supervivencia bacteriana

DPID: Conteo de UFC/mL después del inicio de la desecación.

AD: Conteo de UFC/mL antes de la desecación.

Los ensayos de desecación-rehidratación para las cepas mutantes se realizó con el mismo protocolo, pero utilizando medio LB suplementado con 100 µg/mL de cloranfenicol y 50 µg/mL de kanamicina.

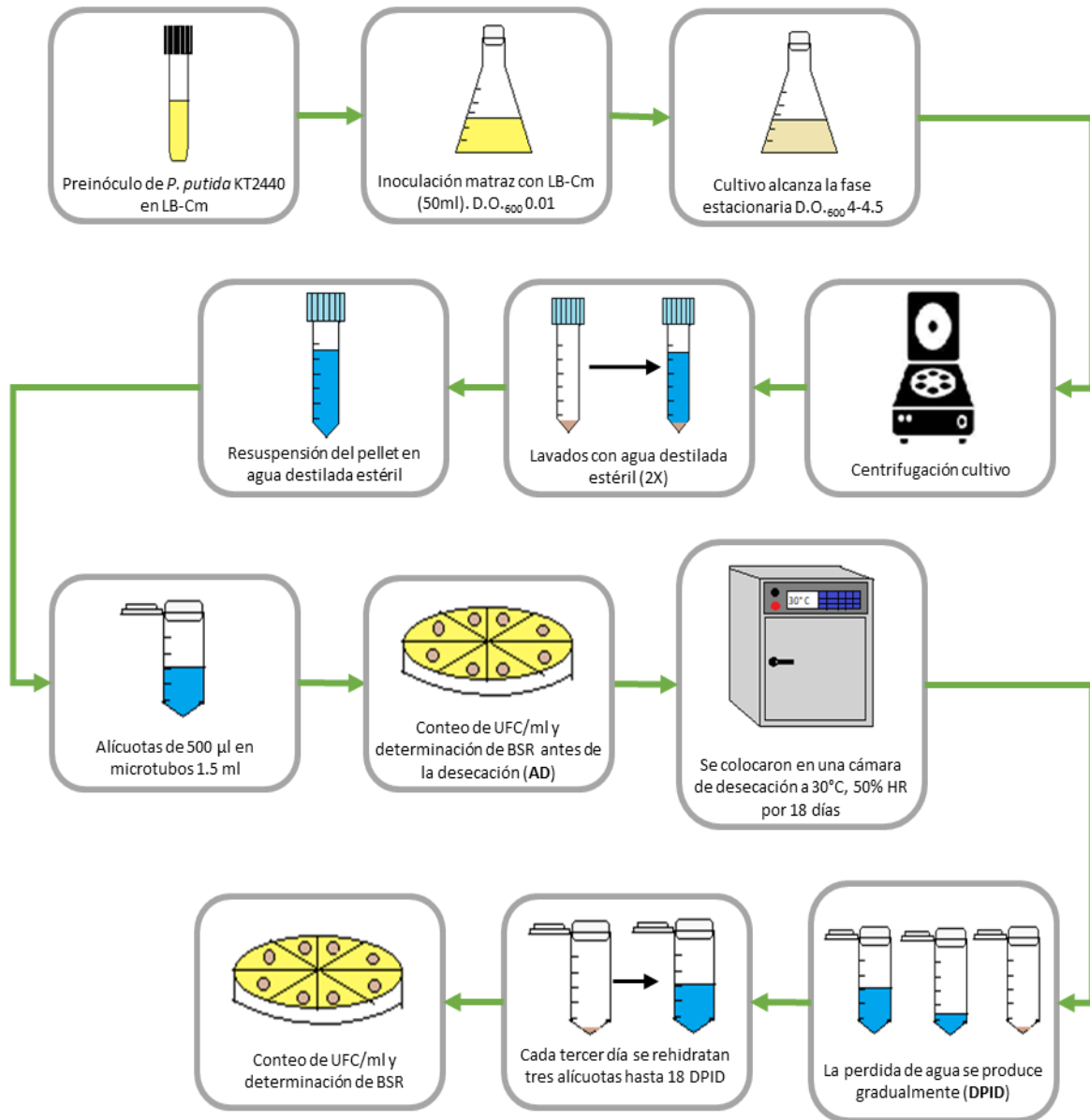


Figura 6. Diagrama de ensayo de desecación.

6.3 Microarreglos de *P. putida* KT2440 en condiciones de desecación-rehidratación

Para determinar los genes involucrados en el proceso de desecación-rehidratación de *P. putida* KT2440, la bacteria se sometió al proceso de desecación durante 18 días en las condiciones anteriormente descritas (Apartado 6.2), se evaluó el perfil de expresión 18 DPID para la condición de rehidratación corta (20 minutos) y rehidratación prolongada (24 horas), ambos perfiles se compararon con respecto a las muestras antes de la desecación, en la figura 7 se describe el procedimiento de los microarreglos.

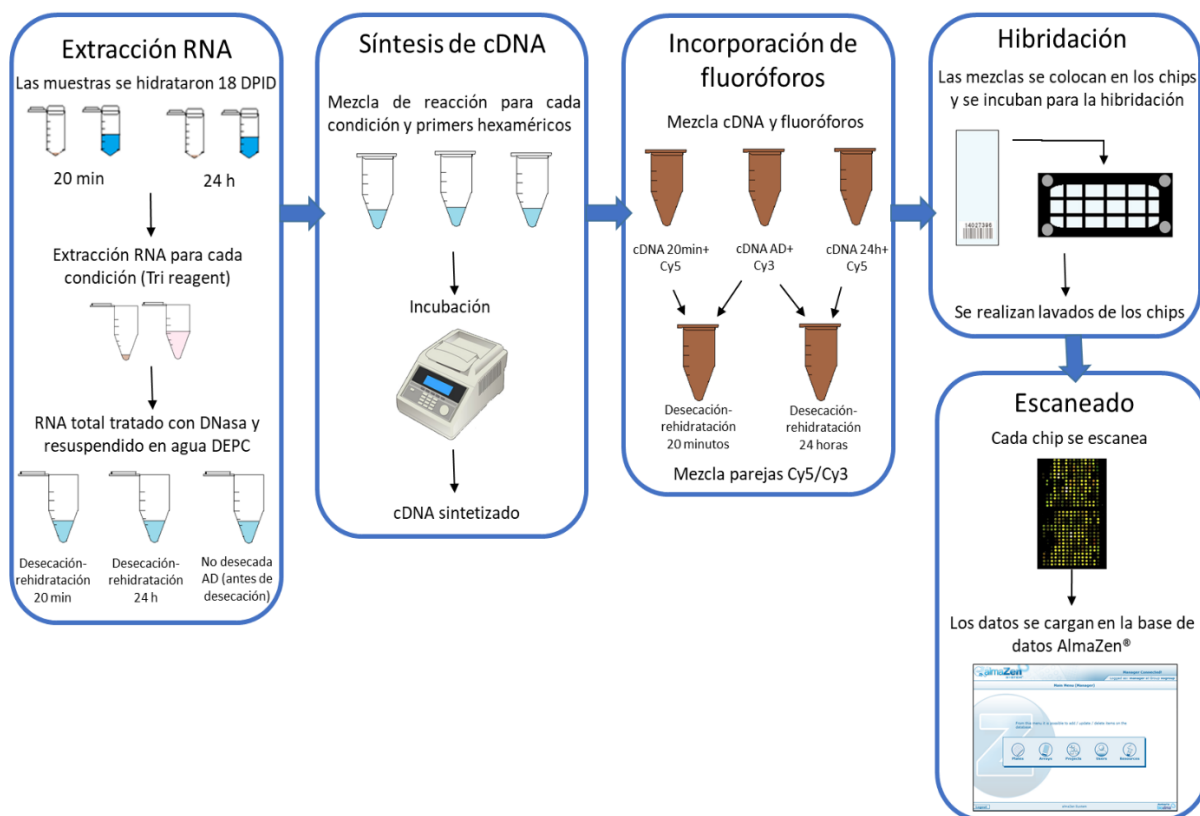


Figura 7. Procedimiento de microarreglos de cDNA para *P. putida* KT2440.

- **Extracción de RNA**

La extracción de RNA total se llevó a cabo con 30 alícuotas para cada condición (volumen de 15 mL por condición). Se descartó el sobrenadante y al pellet se le añadió 1.6 mL de TRI Reagent (Ambion™) precalentado a 70 °C y se homogenizó con una pipeta para ser transferido a un tubo de 2 mL; previamente precalentado a 65 °C, y se



dejó incubando por 10 minutos a 65 °C. A continuación, se centrifugaron los tubos por 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante se colectó en un tubo de 2 mL. Se realizó la separación de fases con BCP (1-bromo-3-cloropropano), añadiendo al sobrenadante 160 µL del reactivo y se incubó a temperatura ambiente (TA) por 15 minutos, posteriormente se centrifugó por 15 minutos a 4 °C, la suspensión se colocó 1 minuto en hielo para después transferir la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo. A continuación, se realizó la precipitación del RNA, para ello se agregó 1 volumen de isopropanol y se incubaron a 10 minutos a TA. Las muestras se centrifugaron a velocidad máxima a 4 °C durante 8 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 1 mL de Etanol al 70% (resuspendido con agua DEPC), se centrifugó a TA por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante, los tubos se colocaron con las tapas abiertas para evaporar los restos de etanol. El pellet se rehidrató con 80 µL de Agua DEPC a 55 °C durante 15 minutos. Para eliminar el DNA presente en la muestra se utilizó el *kit* Turbo DNA free kit (Invitrogen™) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se almacenaron a -80 °C. La cuantificación del RNA se realizó determinando la absorbancia a 280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific™ UV-Vis).

- **Síntesis de cDNA**

Para el alineamiento se realizó una mezcla de RNA y oligonucleótidos (pd(N)6 random hexamer), se llevaron a un volumen de 13.5 µL con agua DEPC. La mezcla se incubó con los parámetros mostrados en la tabla 2:

Tabla 2. Síntesis de cDNA.

Componentes:	Condiciones:
25 µg de RNA	70 °C por 10 minutos
7.5 µg oligonucleótidos	25 °C por 10 minutos
Agua	4 °C por tiempo indefinido
Vol. Total: 13.5 µL	

El siguiente paso consistió en realizar la reacción de extensión del cDNA bajo las condiciones descritas en la tabla 3.

Tabla 3. Extensión de cDNA.

Componentes:		Condiciones:
Mezcla de oligonucleótidos y RNA	16.5 μ L	Incubar 2 horas a 42 °C en el termociclador.
RT buffer 5x	6 μ L	
DTT 0.1 M	3 μ L	
RNase OUT (40 U/ μ L)	1 μ L	
SuperScript II RT (200 U/ μ l)	2 μ L	
50x dNTPs/aa-dUTP mix	0.6 μ L	
H ₂ O DEPC	3.9 μ L	
Vol. Total:	30 μL	

Además, se eliminó el RNA no transcrito en cDNA por hidrólisis alcalina, añadiendo a la mezcla de reacción 10 μ L de EDTA 50 mM pH 8 y 10 μ L de NaOH 1 N e incubada a 65 °C durante 15 minutos, transcurrido el tiempo se neutralizó la reacción agregando 25 μ L de HEPES 1 M pH 7. La eliminación de oligonucleótidos y dNTPs no incorporados se realizó con el *kit* PCR purificación QIAGEN™, se cuantificó y seco por 40 minutos en un equipo de vacío speed-vac.

- **Incorporación de fluoróforos**

El cDNA seco se resuspendió en una solución de NaHCO₃ 0.1 M pH 9.0, posteriormente se incorporaron los fluoróforos durante 2 horas en condiciones de oscuridad. El marcaje se realizó utilizando Cy3 fluorophore (CyTM3 monofunctional reactive dye; Amersham Pharmacia™) para las muestras antes de la desecación y CyTM5 fluorophore (CyTM5 monofunctional reactive dye; Amersham Pharmacia™) para las muestras después de la desecación. Al terminar el tiempo de incubación se agregó hidroxilamina 4 M durante 15 minutos a temperatura ambiente (*Quenching*).

El cDNA marcado se purificó con el *kit* PCR purification de QIAGEN™ y se llevó a un volumen de 50 μ L de tampón fosfato 4 mM, pH 8.5 en microtubos ámbar de 1.5 mL. Se procedió a medir la densidad de marcaje en el espectrofotómetro (pmoles de CyDye/ μ g de cDNA) y se mezclaron las parejas Cy5/Cy3 y secaron en el *speed-vac* (en oscuridad) durante 1 hora.



- **Hibridación**

Los *chips* (Progenika Biopharma™) empleados en este trabajo consistieron en 11520 puntos, 5539 ORFs (50-mer) colocados por duplicado, 20 puntos de control de homogeneidad por duplicado y 203 puntos controles negativos en diversas posiciones.

Los *chips* se limpiaron con aire comprimido y se colocaron en la solución de bloqueo (5x SSC; 0.1% SDS; 1% BSA) a 42 °C por 45 minutos, se realizaron 2 lavados con agua milliQ y uno con isopropanol, posteriormente se centrifugaron los *chips* en tubos falcon de 50 mL. El cDNA marcado con los fluoróforos fue rehidratado con 35 µL de solución de hibridación (5x SSC; 25% (v/v) formamida; 0.5% (p/v) SDS; 5%(p/v) dextran sulfate; 5x solución Denhardt's: Ficoll; polyvinylpyrrolidone; BSA) precalentada a 42 °C y se prosiguió a la desnaturalización a 98 °C por 3 minutos. Las muestras se colocaron al centro de un cubreobjetos y encima se depositó el *chip*, para cada muestra y condición. Se incubaron por 20 horas a 42 °C en una cámara de hibridación (ArrayIt Hybridization Cassette).

- **Lavado y escaneado**

Se realizaron cuatro lavados para cada *chip* utilizando cuatro soluciones de lavado (Tabla 4). El procedimiento para cada lavado se describe en la tabla 5.

Tabla 4. Preparación de las soluciones de lavado.

Solución	Preparación
Solución de lavado 1	Citrato de sodio salino (SSC) 2X, SDS 0.1%
Solución de lavado 2	SSC 1X
Solución de lavado 3	SSC 0.2X
Solución de lavado 4	SSC 0.1X

Tabla 5. Procedimiento de lavados.

Procedimiento de lavado de <i>chip</i>	
Lavado 1	La solución 1 se precalentó a 42 °C en agitación constante hasta desprender los cubre objetos y posteriormente se volvió a colocar en la solución 1 y se incubó 5 minutos en agitación constante.
Lavado 2	Se cambia el <i>chip</i> a la solución 2 y se incubaron 5 minutos con agitación constante, se repitió una vez este paso.
Lavado 3	En la solución de lavado 3 se incubaron 5 minutos con agitación constante.
Lavado 4	El último lavado se llevó a cabo utilizando la solución de lavado 4, y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente.

El secado de los *chips* se realizó en tubos falcon de 50 mL por medio de centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar el secado, los *chips* se escanearon con el Biochip Scanner 4100 A (Axon Corporation™) y se utilizó el programa GenePix™ Pro 5.1 software, cada *chip* se escaneó tres veces por punto.

6.4 Análisis de expresión diferencial

Se realizó el análisis de las imágenes y los resultados se recabaron en archivos (.gps). Los archivos fueron cargados en la base de datos AlmaZen (<http://almazen.eez.csic.es:8230/almazen/jsp/login.html>, desarrollado por Bioalma™). La normalización de los datos se efectuó por regresión lineal en escala logarítmica para ambos canales. El análisis de expresión diferencial se realizó dentro de la plataforma AlmaZen en la herramienta “*Comparative experiments*”, donde se aplicaron los siguientes filtros para la obtención de los genes diferencialmente expresados: *Fold change* (< -2, >2), *Av. Signal* (>64, >64) y *p-value* (< -0.05, >0.05). La prueba T-pareada se aplicó para el análisis de significancia antes del cálculo de los valores de P.

6.5 Clasificación funcional por ontología y rutas metabólicas

La clasificación funcional de los genes diferencialmente expresados en ambas condiciones se realizó utilizando los términos GO correspondientes a la categoría de proceso biológico anotados en las bases de datos *Pseudomonas Genome Database* (PGD, <http://www.pseudomonas.com>) y *EcoCyc E. coli Database* (EcoCyc, <https://ecocyc.org/>).



La búsqueda de los genes regulados positiva y negativamente en la biosíntesis de aminoácidos y catabolismo de la fenilalanina se realizaron en la base de datos Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG <https://www.kegg.jp/>).

6.6 Validación de genes diferencialmente expresados en *P. putida* KT2440 por RT-qPCR

Con la finalidad de validar los resultados obtenidos del ensayo de desecación-rehidratación de 20 minutos, evaluados por microarreglos, se midió la expresión de los 6 genes por la técnica de RT-qPCR. Se evaluó su expresión en células no desecadas (antes de la desecación), células desecadas no hidratadas, células desecadas-rehidratadas 20 minutos y células desecadas-rehidratadas 24 horas.

- **Extracción de RNA total de células no desecadas, desecadas no hidratadas y desecadas-rehidratadas**

Para la extracción de RNA de las células para cada condición anteriormente mencionada, se utilizó el *pellet* de cinco alícuotas por condición, posteriormente se centrifugaron a 8000 rpm. El *pellet* se resuspendió en 500 µL de la solución de lisis (SDS 0.5%, Acetato de sodio 20 mM y EDTA 10 mM) y se homogenizó, inmediatamente se agregaron 500 µL de fenol-ácido cloroformo (precalentado a 65 °C), se incubó la suspensión por 10 minutos a 65 °C. Al término de la incubación se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos, se observó la formación de dos fases. La fase superior se transfirió a un nuevo tubo y se agregaron 500 µL de fenol cloroformo caliente e incubó durante 10 minutos a 65 °C, se centrifugaron a 14000 rpm por 10 minutos, se repitió dos veces el paso anterior. Se añadió 500 µL de alcohol isoamílico al sobrenadante, se mezcló con el vórtex y se procedió a centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos, este paso se repitió una vez más. Al sobrenadante se le añadieron 2.5 volúmenes de etanol absoluto y se precipitó por 24 h a -80 °C. La mezcla se centrifugó a 14000 rpm y se descartó el sobrenadante. Finalmente se realizó un lavado con 500 µL de etanol al 70%. El *pellet* se resuspendió con agua DEPC y se almacenó a -80 °C hasta su uso.



- **Eliminación de DNA contaminante de las muestras de RNA total de células no desecadas, desecadas no hidratadas y desecadas-rehidratadas de *P. putida* KT2440**

La eliminación del DNA contaminante para cada muestra se llevó a cabo empleando el TURBO DNA-free Kit (Invitrogen™). La reacción se hizo en un volumen de 50 μL , la mezcla incluyó 10 μg de RNA total, 2U de la enzima DNasa (TURBO DNase™) y 0.1 volúmenes del buffer (10X TURBO DNase™). La mezcla se incubó a 37 °C por 30 minutos, al finalizar el tiempo de incubación se agregó 0.1 volúmenes del buffer de inactivación de la enzima (DNase Inactivation Reagent™) e incubó por 5 minutos a TA, a continuación, se centrifugaron a 14000 rpm por 1.5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo evitando succionar el precipitado blanco. Las muestras con el RNA tratado se cuantificaron y almacenaron a -80 °C hasta su uso.

- **Síntesis de cDNA de las muestras no desecadas, desecadas no hidratadas y desecadas-rehidratadas de *P. putida* KT2440**

La síntesis de cDNA se realizó con el *kit* High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied biosystems™), para la mezcla de reacción se utilizó: 0.5 μg del RNA previamente tratado con DNasa y los oligonucleótidos reversos (Tabla 8) a una concentración de 10 μM . Las condiciones de retrotranscripción se revisan en la Tabla 6.

Tabla 6. Mezcla de reacción y condiciones de síntesis de cDNA.

Componentes	Condición de retrotranscripción	
10X RT Buffer	1.0 μL	25 °C X 10 minutos
25X dNTP's mix	0.4 μL	37 °C X 120 minutos
Transcriptasa reverse	0.5 μL	85 °C X 5 minutos
Agua	2.1 μL	4 °C X 10 minutos
Mezcla de oligonucleótidos reversos	1.0 μL	
RNA tratado DNasa	5.0 μL	
Vol. Final: 10 μL		

Se realizó la amplificación de los 6 genes diferencialmente expresados del ensayo de rehidratación corta (20 minutos) por medio de PCR punto final, la mezcla incluyó cDNA como templado y cada par de oligonucleótidos (Tabla 8), bajo las condiciones descritas

en la tabla 7. Se visualizó la amplificación mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Tabla 7. Condiciones de PCR punto final para templado de cDNA.

Componentes		Condiciones	
Master mix Go Taq (Promega™)	10.0 µL	95 °C, 5 minutos	} 30 ciclos
Oligonucleótido directo	1.0 µL	95 °C, 30 segundos	
oligonucleótido reverso	1.0 µL	55 °C, 30 segundos	
Agua	6.0 µL	72 °C, 20 segundos	
cDNA	2.0 µL	72 °C, 8 minutos	
Vol. Total:	20 µL	4 °C, 10 minutos	

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los 6 genes diferencialmente expresados del ensayo de microarreglos en la condición de rehidratación 20 minutos.

Oligonucleótidos	Secuencia 5'→3'	Producto
2676F	GTACGCCTGCAACTGATCT	PP_2676 Proteína de unión a periplasma putativa (pedG)
2676R	TCGGCCAATTGCTGATGA	
2662F	CCAACCTACCTAGGCTTCAACAT	PP_2662 Porina etilenglicol
2662R	GTTGGTTTCACTGTCGTTGATG	
3451F	TGGACAAGCCGTTGCATATC	PP_3451 Proteína hipotética
3451R	CTGCCACCACACAGTCAAG	
880F	CACCTGGCAGTTCATCCT	PP_0880 Transportador ABC de dipéptidos permeasa (dppc)
880R	TCAGTGACATCACCACTGAC	
1446F	TCAGCTCGGTCAAGGTAGAT	PP_1446 Receptor dependiente de TonB
1446R	GCTTCGTAGCCCTTGTTCCT	
256F	CTGACCAGGCCGAATTCTATAC	PP_0256 Oxidorreductasa putativa
256R	GAGCAGTCAGGGAAGTTGTT	
rpoNF	CTGGTAGAACTGAACCAGGAAG	Factor sigma-54
rpoNR	GTTGCGCATGAAGGTGTTG	

- **Determinación de la expresión de los genes 6 genes en células no desecadas, desecadas no hidratadas y desecadas-rehidratadas de *P. putida* KT2440**

La PCR cuantitativa se realizó utilizando 20 ng de cDNA y 6 μ M de oligonucleótidos (directo y reverso) para cada condición. La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pozos y la amplificación en el termociclador 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems™) bajo las condiciones descritas en la tabla 9. Cada condición se evaluó por triplicado. Se empleó el gen *rpoN* como gen endógeno o normalizador (Follonier *et al.*, 2013).

Tabla 9. Condiciones de RT-qPCR.

Componentes		Condiciones	
SYBR Green PCR Master Mix	10.0 μ L	95 °C, 5 minutos	} 30 ciclos
Oligonucleótido directo	1.0 μ L	95 °C, 30 segundos	
Oligonucleótido reverso	1.0 μ L	55 °C, 30 segundos	
Agua	8.0 μ L		
cDNA	20 ng		
Vol. Total:	20 μL		

Los datos fueron analizados con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001):

$$\Delta\Delta CT = [(CT \text{ gen de interés} - CT \text{ control interno}) DD - (CT \text{ gen de interés} - CT \text{ control interno}) AD]$$

DD: Después de la desecación

AD: Antes de la desecación

Control interno: Gen *rpoN* normalizador

6.7 Análisis del daño a membrana en células *P. putida* KT2440 y las cepas derivadas por microscopía de fluorescencia

Sé evaluó el daño a membrana de las células de *P. putida* KT2440 y las mutantes, para ello se utilizaron células no desecadas y células desecadas-rehidratadas 20 minutos y se tiñeron con el *kit* LIVE/DEAD® BacLight™ *Bacterial Viability Kit for microscopy*, siguiendo las recomendaciones del fabricante. El *kit* consta de los fluoróforos SYTO9 (500-550nm) y yoduro de propidio (420-490nm), el primer fluoróforo permea la membrana de las células y se tiñen de color verde, por el contrario, el segundo fluoróforo penetra



las células con la membrana dañada y tiñe las células de rojo (Anexo 5). Las células se observaron en el microscopio de fluorescencia VE-14YT. El *Merge* (unión) de las imágenes se realizó en el software ImageJ (Schneider *et al.*, 2012)

VIII. RESULTADOS

7.1 Determinación de la supervivencia de *P. putida* KT2440 a desecación

Para determinar la tolerancia a desecación de *P. putida* KT2440, la bacteria se sometió al proceso de desecación-rehidratación durante 18 días a 30 °C y 50% HR. El conteo inicial de células en el día cero o antes de la desecación (AD) fue de 10.4×10^{10} UFC/mL y la BSR se estableció como 100.

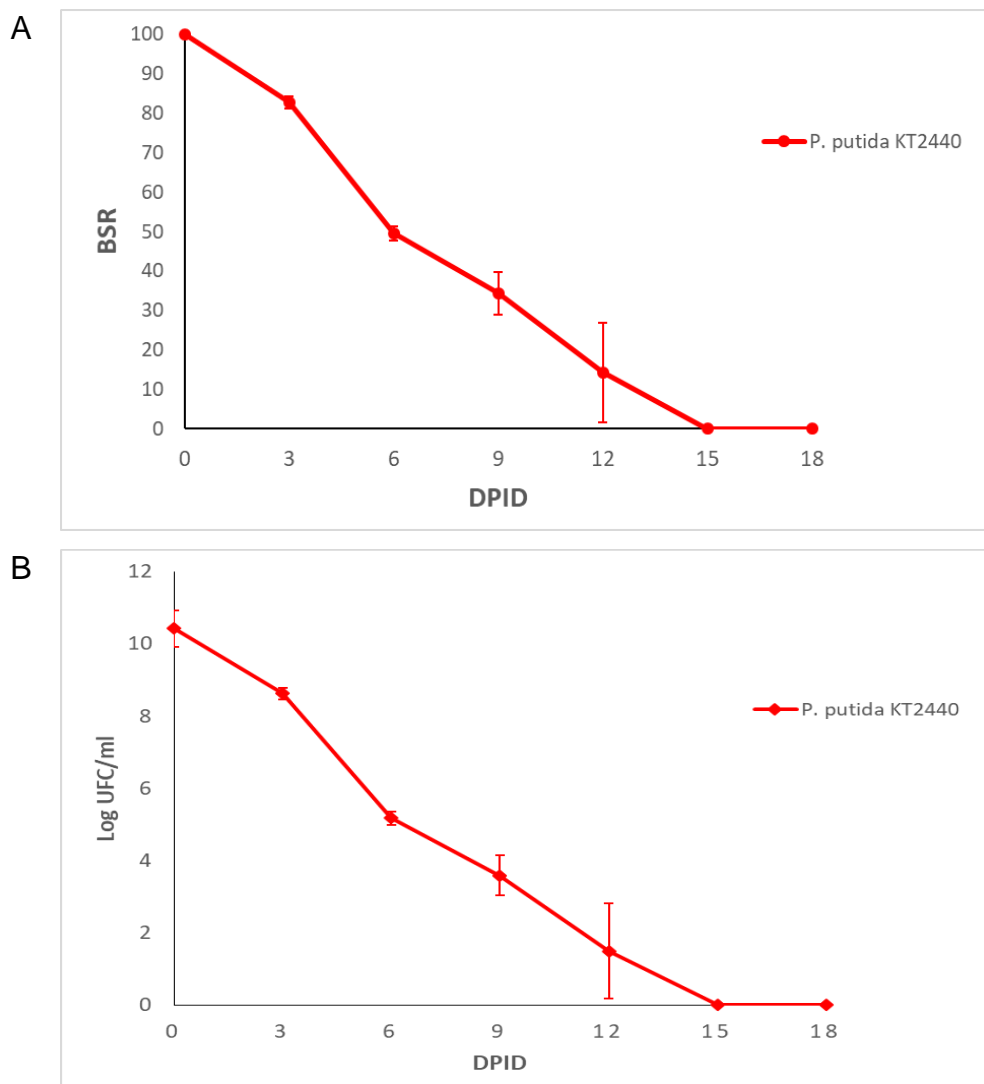


Figura 8. Supervivencia de *P. putida* KT2440 durante el proceso de desecación-rehidratación 20 minutos por 18 días a 30 °C y 50% HR. **A)** BSR y **B)** Log UFC/mL.



Posterior a los 6 DPID las muestras se secaron completamente. Para el día 15 después del inicio de la desecación y rehidratación de 20 minutos el conteo de células y BSR descendió a cero y continuó hasta el día 18 DPID. En la figura 8 se muestra el comportamiento de *P. putida* KT2440 durante el proceso de desecación-rehidratación 20 minutos. De acuerdo con estos resultados y otros antecedentes del grupo, *P. putida* KT2440 es poco tolerante a la desecación.

Para el caso de 18 DPID y rehidratación de 24 horas, el conteo de UFC/mL y BSR resultó mayor que los valores obtenidos con la rehidratación corta (20 min), $4.1 \times 10^4 \pm 0.18$ UFC/mL y 38.3 ± 0.17 , respectivamente. Sugiriendo así que *P. putida* KT2440 utiliza el estado viable no cultivable (VBNC) como estrategia de supervivencia ante el estrés por desecación, ya que posterior a la rehidratación prolongada retorna al estado cultivable.

Con el objetivo de identificar los genes involucrados en el retorno del estado VBNC de *P. putida* KT2440, se realizó el análisis transcriptómico de las células desecadas-rehidratadas 20 minutos y células desecadas-rehidratadas 24 horas, y la expresión se comparó con el transcriptoma de las células no desecadas (AD).

7.2 Perfil transcriptómico de células desecadas-rehidratadas 20 minutos y células desecadas-rehidratadas 24 horas de *P. putida* KT2440

Se determinó el transcriptoma por microarreglos para ambas condiciones, con ese fin se realizó la extracción de RNA de células no desecadas, células desecadas-rehidratadas 20 minutos y células desecadas-rehidratadas 24 horas, las muestras se corrieron en gel de agarosa (Figura 9). Posterior a la síntesis de cDNA las muestras se hibridaron en *chips* (Progenika). Cada condición se realizó por triplicado.

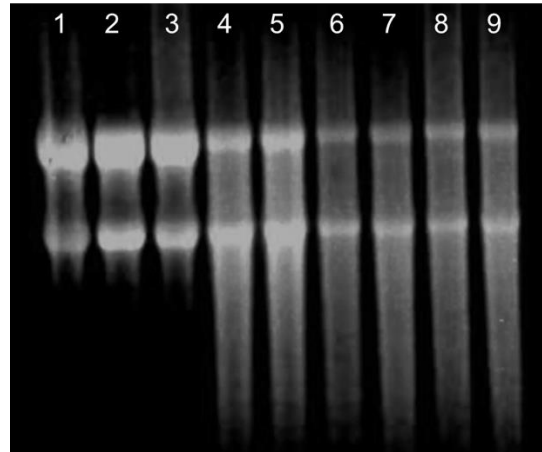


Figura 9. Electroforesis de RNA tratado con DNasa utilizado para los ensayos de microarreglos. Carril:1-3 muestras no desecadas; Carril 4-6: muestras desecadas-rehidratadas 20 minutos; Carril 7-9: muestras desecadas-rehidratadas 24 horas.

Las imágenes obtenidas de las lecturas de cada *chip* se procesaron en el *software* Genepix, posteriormente los datos se cargaron en la plataforma ALMAZEN (Bioalma™) para realizar el análisis estadístico de cada condición. En el análisis transcripcional de las células desecadas-rehidratadas de 20 minutos se obtuvieron 6 genes diferencialmente expresados (Figura 10). Cada punto en ambos gráficos corresponde a un gen, los puntos en azul representan los genes diferencialmente expresados. En la gráfica MA, A corresponde a el nivel de expresión promedio de un gen en ambos canales (Canal verde: células no desecadas; Canal rojo: células desecadas-rehidratadas) y M la diferencia de expresión de un gen en un canal con respecto al otro, los valores positivos de M indican que se trata de un gen sobreexpresado, por el contrario, los valores de M negativos indican un gen reprimido. En la figura 10 la gráfica A representa el nivel de expresión promedio de un gen en ambos canales y la gráfica B, el “*fold change*” que es el número de veces que la expresión de un gen en un canal es mayor o menor a la expresión con respecto al otro.

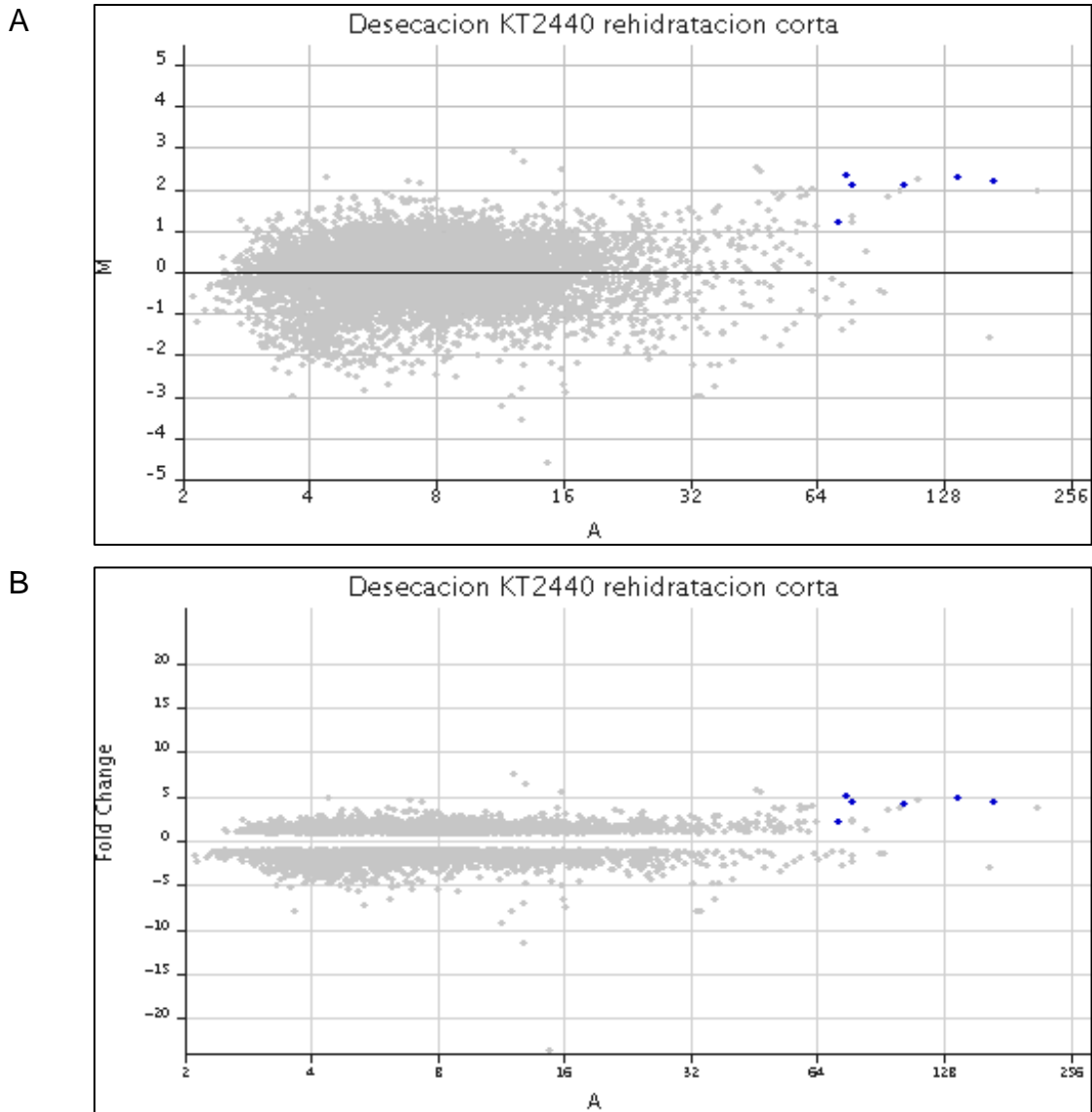


Figura 10. Análisis de expresión diferencial de genes de las células de *P. putida* KT2440 desecadas-rehidratadas 20 minutos, cada punto en azul representa un gen que cumple con los parámetros $FC \geq 2$ y $FC \leq 2$, Av. signal > 64 y P-value < 0.005 . **A)** Gráfica MA y **B)** Gráfica del “Fold change”.

En contraste, en el análisis transcriptómico de las células desecadas-rehidratadas por 24 horas (rehidratación prolongada) se obtuvieron 191 genes diferencialmente expresados (Figura 11).

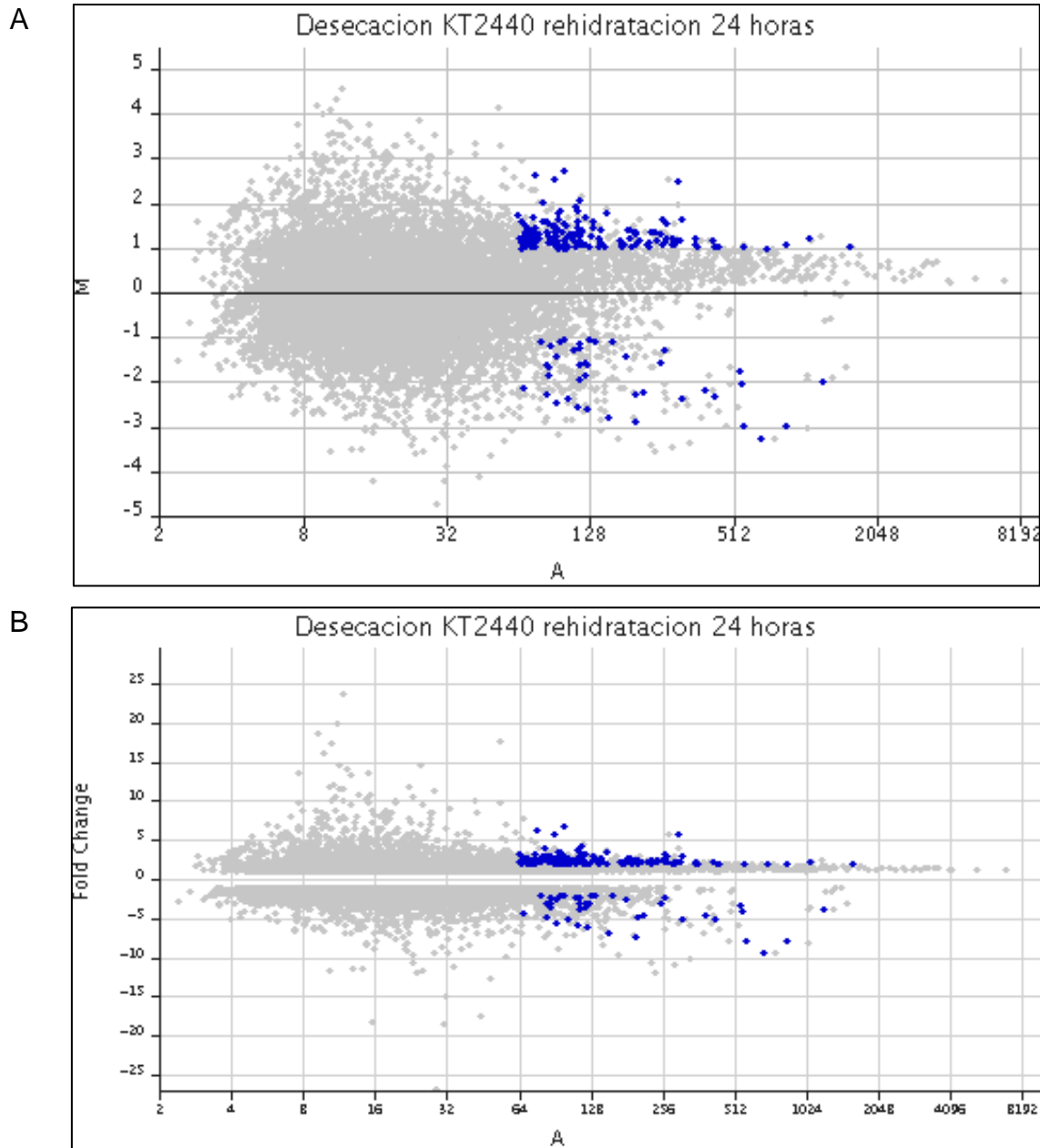


Figura 11. Análisis de expresión diferencial de los genes de las células de *P. putida* KT2440 desecadas-rehidratadas 24 horas, los puntos en azul representan los genes que cumplen con los parámetros: $FC \geq 2$ y $FC \leq -2$, Av. signal > 64 y P-value < 0.005 . **A)** Gráfica MA y **B)** Gráfica “Fold change”.

En el siguiente diagrama de Venn se describe la comparación entre los resultados de microarreglos del ensayo de desecación-rehidratación corta y desecación-rehidratación prolongada. Se obtuvo un mayor número de transcritos en los ensayos de rehidratación

de 24 horas que en la rehidratación de 20 minutos y solo un gen (PP_2676) se induce en ambas condiciones (Figura 12).

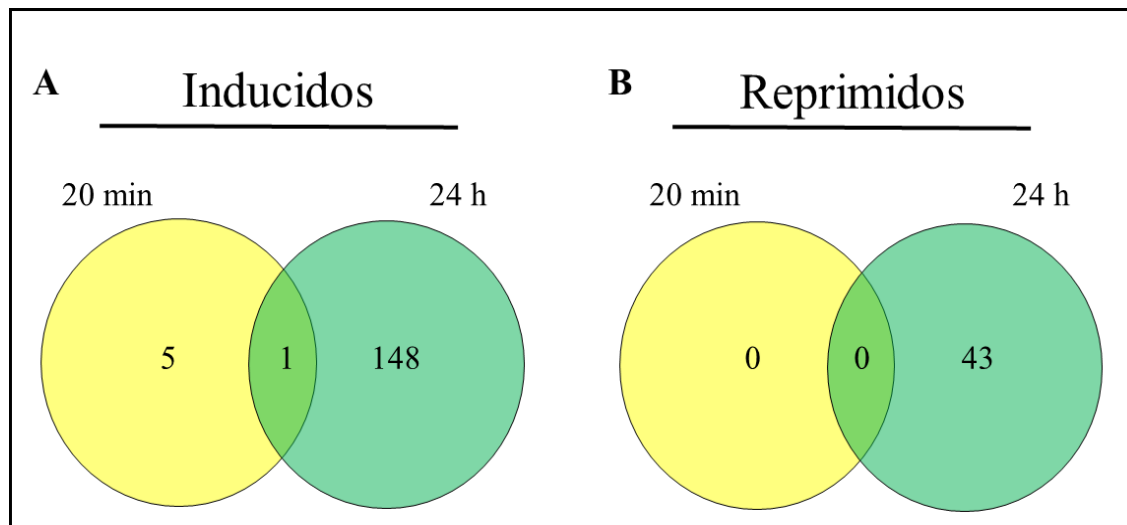


Figura 12. Comparación del análisis transcriptómico de células desecadas-hidratadas 20 minutos y células desecadas-hidratadas 24 horas considerando: **A)** Genes sobreexpresados y **B)** Genes reprimidos.

7.3 Genes diferencialmente expresados en células desecadas-rehidratadas 20 min

En la tabla 10 se enlistan los 6 genes diferencialmente expresados para el ensayo de desecación-rehidratación de 20 minutos obtenidos por microarreglos. Se obtuvieron los términos GOID correspondiente a la categoría de proceso biológico para 3 genes. El gen PP_0256 oxidorreductasa putativa que participa en procesos de óxido-reducción y los genes PP_0880 transportador ABC de dipéptidos permeasa (dppc) y PP_2662 porina que conforme a la clasificación funcional participan en el transporte de transmembrana. Para los genes PP_1446 receptor dependiente de TonB, PP_2676 proteína de unión a periplasma (PedG) y PP_3451 proteína hipotética no se encontró su posible función por clasificación ontológica. Los genes presentaron un “*fold change*” mayor a 4 excepto para el gen PP_3451. La inducción de la expresión de estos genes, sugiere que podrían desempeñar alguna función importante en el retorno del estado VBNC, ya que a pesar de que *P. putida* KT2440 no es recuperada en placa mantiene una transcripción activa de éstos 6 genes.

Tabla 10. Genes diferencialmente expresados durante el proceso de desecación-rehidratación 20 min en *P. putida* KT2440.

Locus	Nombre	Fold change	GOID	Proceso biológico
PP_0256	Oxidorreductasa putativa	4.586	GO:0055114	Proceso Óxido-reducción
PP_0880	Transportador ABC de dipéptidos permeasa (dppc)	4.309	GO:0055085	Transporte transmembrana
PP_1446	Receptor dependiente de TonB	5.162	---	---
PP_2662	Porina etilenglicol	4.884	GO:0055085	Transporte transmembrana
PP_2676	Proteína de unión a periplasma putativa (pedG)	4.404	---	---
PP_3451	Proteína hipotética	2.309	---	---

7.4 Validación de los genes diferencialmente expresados por RT-qPCR

Para corroborar los resultados obtenidos de los análisis por microarreglos se procedió a medir la expresión de los 6 genes del experimento de desecación-rehidratación 20 minutos por medio de la técnica de RT-qPCR. Se consideraron cuatro condiciones a evaluar: 1) células no desecadas (AD), 2) células desecadas 18 días sin hidratar (para evaluar la expresión de los genes durante el estado VBNC), 3) células desecadas-rehidratadas 20 min y, 4) células desecadas-rehidratadas 24 h.

Para realizar los ensayos se extrajo RNA total de las células de *P. putida* KT2440 para cada condición, las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1% (Figura 13). Posteriormente, se trataron las muestras de RNA total con el DNA free kit, para eliminar el DNA contaminante de cada una y se realizó la electroforesis en gel de agarosa 1% (Figura 13).

El siguiente paso consistió en realizar la síntesis de cDNA a partir del RNA tratado para cada condición. Finalmente, se llevaron a cabo los ensayos RT-qPCR para los 6 genes

y 4 condiciones estudiadas, los resultados se analizaron utilizando el método $\Delta\Delta^{CT}$ (Figura 14).

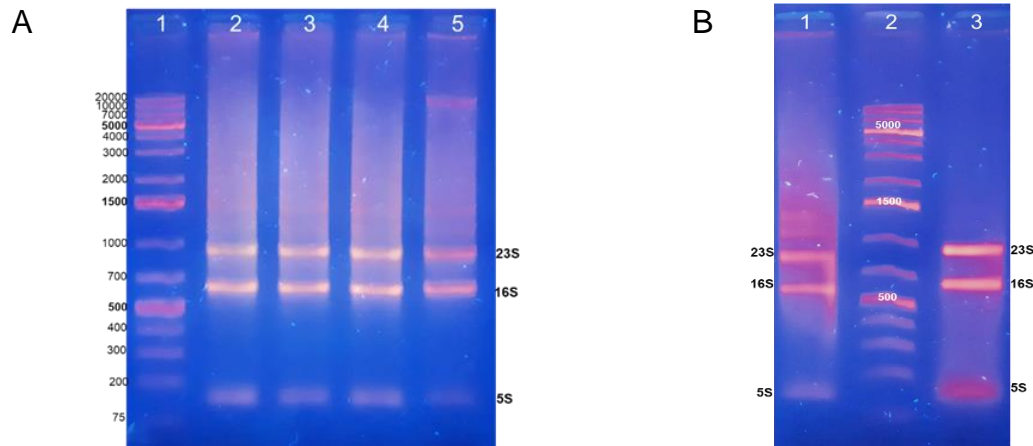


Figura 13. A) Electroforesis de RNA total de células no hidratadas, desecadas-rehidratadas 20 min, desecadas-rehidratadas 24 h y no desecadas. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2 : células desecadas no hidratadas; Carril 3: células desecadas hidratadas 20 minutos; Carril 4: células desecadas hidratadas 24 horas; Carril 5: células no desecadas. **B)** Electroforesis de RNA total y RNA tratado con DNAsa de células no desecadas de *P. putida* KT2440. Carril 1: RNA total de *P. putida* KT2440; carril 2: Marcador de peso molecular; carril 3: RNA tratado con DNAsa.

El gen PP_3451 que codifica para una proteína hipotética de función desconocida no presentó cambios significativos para las condiciones de células desecadas no hidratadas (VBNC) y células desecadas-hidratadas 20 minutos con respecto a las muestras no desecadas. Por el contrario, el nivel de expresión aumento a 2 para la condición desecación-hidratación 24 horas.

El nivel de expresión del gen PP_2676 proteína putativa de unión a periplasma obtuvo un “*fold change*” de 42 en células desecadas no rehidratadas (estado VBNC) con respecto a las células no desecadas, mientras que para la condición de desecación-rehidratación de 20 minutos el aumento de la expresión fue de 19 veces y para las muestras desecadas-hidratadas 24 horas la expresión se incrementó 49 veces. Interesantemente el gen PP_2662 que codifica para una porina mostró los niveles de expresión más altos en todas las condiciones evaluadas. El nivel de expresión de PP_2662 para las células desecadas no rehidratadas (estado VBNC) fue 98 veces más

alto que las células no desecadas. Para las células desecadas-hidratadas 20 minutos y 24 horas el nivel de expresión fue 76 y 75 veces más alto que la condición control (bacterias no desecadas).

El gen PP_1446 receptor dependiente de TonB se expresó 6 veces más en bacterias desecadas no-hidratadas (VBNC) que en la condición no desecada (control). La expresión del gen en las células desecadas-hidratadas 20 minutos fue incluso mayor, 19 veces más que la condición control. Y para la condición desecación-hidratación 24 horas el aumento de la expresión fue de 3 veces.

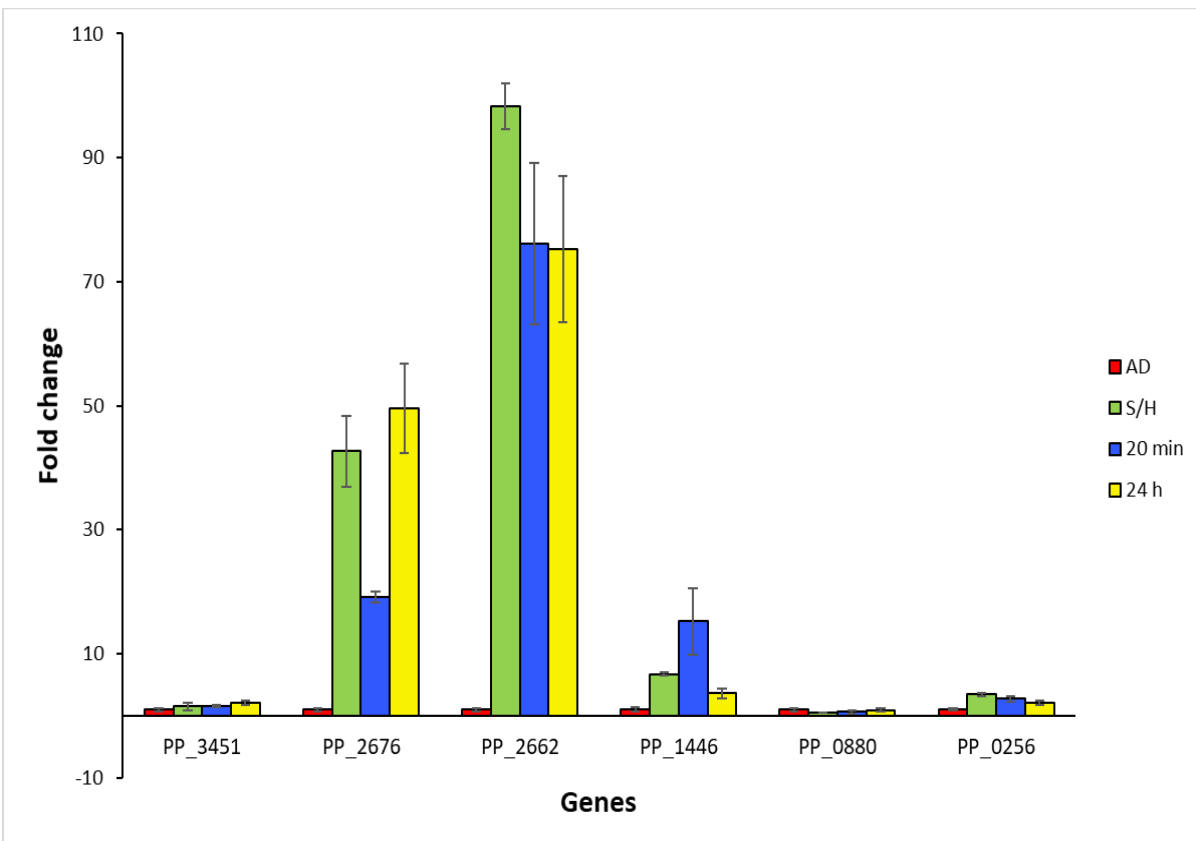


Figura 14. Expresión relativa de los genes PP_3451, PP_2676, PP_2662, PP_1446, PP_0880 y PP_0256, antes del inicio de la desecación (AD), 18 DPID sin hidratar (S/H), 18 DPID rehidratación 20 minutos (20 min) y 18 DPID rehidratación 24 h (24 h). Los datos se normalizaron con el gen *rpoN*.

Los niveles de expresión del gen PP_0880 transportador ABC permeasa de dipéptidos no presentaron cambios significativos en ninguna condición.



El gen PP_0256 que codifica para una oxidoreductasa putativa presentó aumentos moderados en su expresión.

Los altos niveles de expresión obtenidos mediante la RT-qPCR sugieren que los genes PP_2662, PP_1446 y PP_2676 podrían tener un rol crucial en el estado VBNC y el probablemente en su retorno. Cinco genes de seis mostraron resultados similares en ambas técnicas, RT-qPCR y microarreglos.

7.5 Evaluación de la supervivencia a desecación de las mutantes de *P. putida* KT2440

Con la finalidad de investigar la importancia de los genes diferencialmente expresados en el proceso de desecación-rehidratación de 20 minutos en el retorno del estado VBNC se evaluó el comportamiento de las mutantes de estos genes sometiénolas a la desecación. Cuatro mutantes de *P. putida* KT2440 fueron donadas por EEZ-CSIC (Anexo 1), sin embargo, las mutantes correspondientes a los genes PP_2662 y PP_2676 no se encontraron disponibles.

Se realizó la identificación molecular de las cepas derivadas de *P. putida* KT2440, para ello se llevó a cabo la extracción del DNA de cada cepa (Figura 15) y se realizó la amplificación del gen 16S para las cinco cepas, obteniendo el amplificado esperado de 1379 pb para cada cepa (Figura 15).

Posteriormente se llevó a cabo la restricción del amplificado del 16S con la enzima *HhaI* dónde se obtuvieron 5 fragmentos con los tamaños esperados correspondientes a la predicción *in silico* (Figura 16).

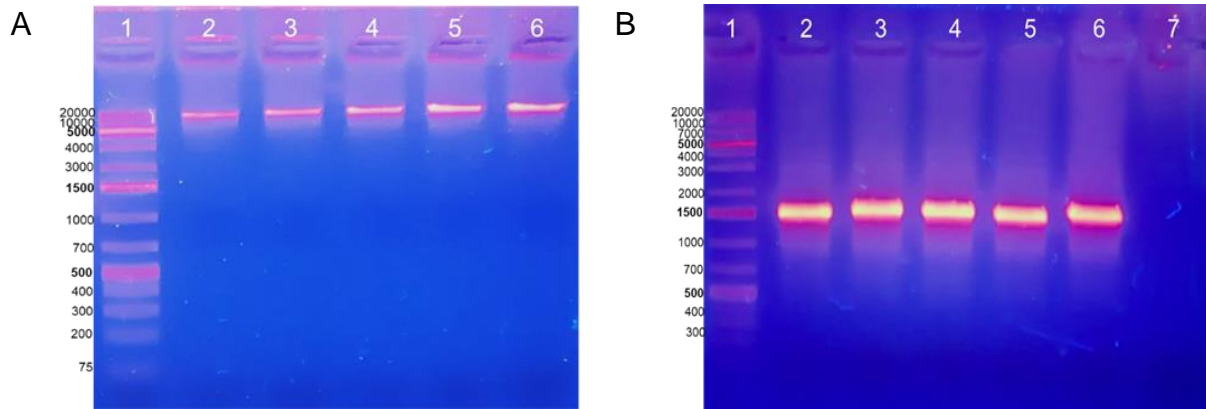


Figura 15. A) Electroforesis de DNA de *P. putida* KT2440 y las mutantes. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: *P. putida* KT2440; Carril 3: Δ PP_3451; Carril 4: Δ PP_1446; Carril 5: Δ PP_0880; Carril 6: Δ PP_0256. **B)** Amplificación del gen 16S. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: *P. putida* KT2440; Carril 3: Δ PP_3451; Carril 4: Δ PP_1446; Carril 5: Δ PP_0880; Carril 6: Δ PP_0256 y Carril 7: control de agua.

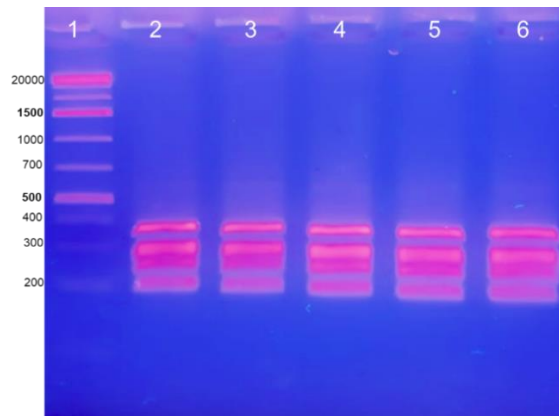


Figura 16. Perfil de restricción del gen 16S con la enzima *HhaI*. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: *P. putida* KT2440; Carril 3: Δ PP_3451; Carril 4: Δ PP_1446; Carril 5: Δ PP_0880; Carril 6: Δ PP_0256.

A continuación, se evaluó el comportamiento de las mutantes Δ PP_3451, Δ PP_1446, Δ PP_0880 y Δ PP_0256 durante el proceso de desecación-rehidratación 20 minutos (Figura 17) y desecación-rehidratación 24 horas (Tabla 12). No se encontró diferencia en el comportamiento de tres mutantes respecto a la silvestre durante el ensayo de desecación-rehidratación corta. No obstante, la mutante Δ PP_1446 sobrevivió 18 DPID, el conteo de bacterias fue de 10^3 UFC/mL y la BSR de 29 (Figura 17), este resultado supone que la mutación en el gen PP_1446 interviene en el proceso de entrada del estado VBNC.

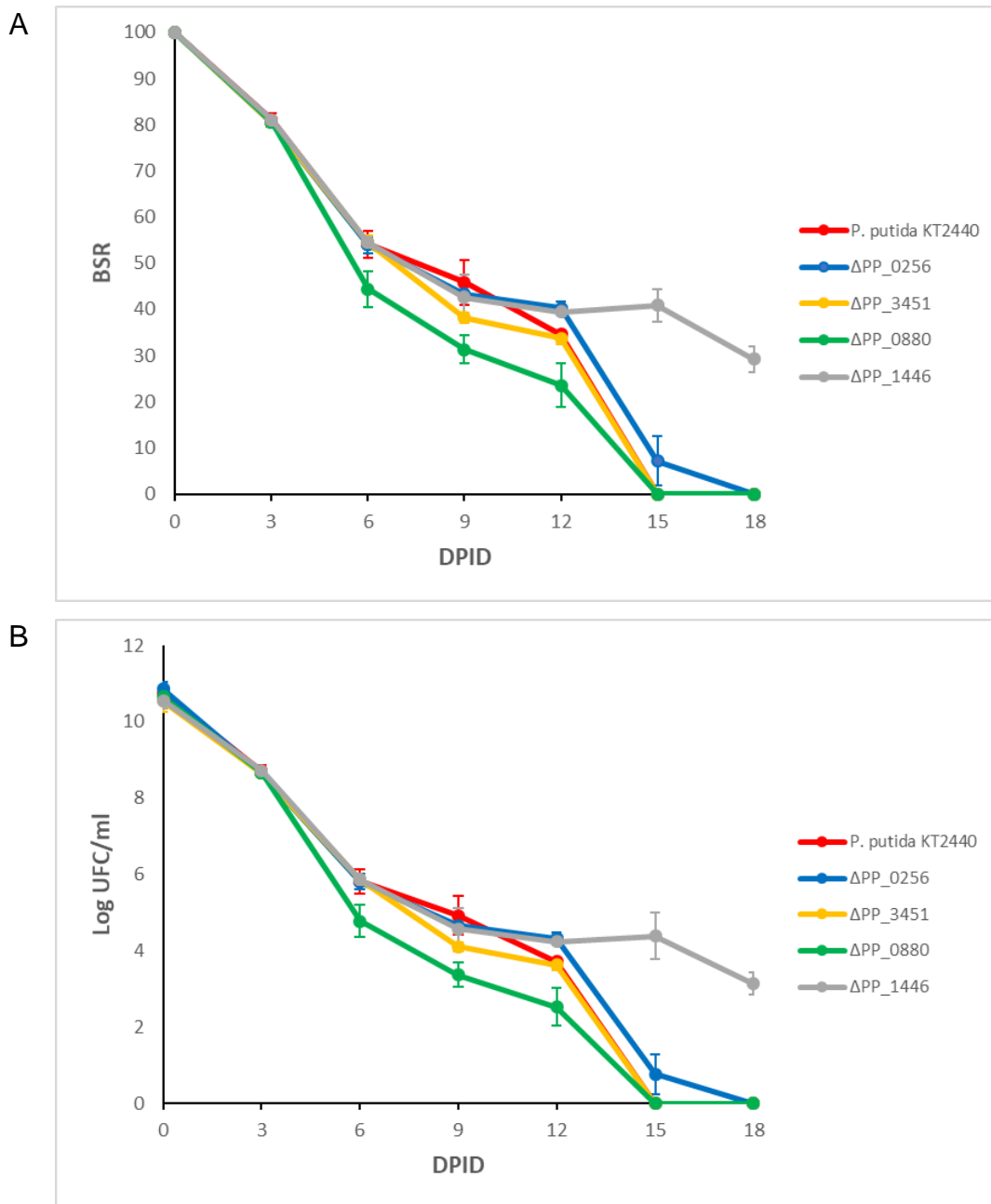


Figura 17. Supervivencia a desecación-rehidratación 20 minutos de *P. putida* KT2440 y cepas derivadas por 18 días a 30 °C y 50%. **A)** BSR y **B)** Log UFC/mL.

Asimismo, se valoró el comportamiento de las mutantes durante el proceso de desecación-rehidratación prolongada, sin embargo, los resultados no presentaron diferencias significativas con respecto a *P. putida* KT2440 (Tabla 11).

Tabla 11. Supervivencia de *P. putida* KT2440 y las mutantes posterior a la desecación-rehidratación de 24 horas.

Supervivencia a desecación-rehidratación 24 horas					
Cepas	<i>P. putida</i> KT2440	Δ PP_0256	Δ PP_3451	Δ PP_0880	Δ PP_1446
Log UFC/mL	3.17±0.03	2.81±0.30	3.32±0.02	3.66±0.07	3.50±0.19
BSR	29.69±0.28	25.90±2.78	31.54±0.24	34.32±0.66	33.26±1.49

7.6 Evaluación de la integridad de la membrana en las mutantes de *P. putida* KT2440

Para determinar si la integridad de la membrana de las cepas derivadas de *P. putida* KT2440 es alterada por la desecación. Se llevó a cabo la tinción de las células bacterianas no desecadas y desecadas-hidratadas 20 min con el kit LIVE/DEAD y la observación al microscopio de fluorescencia de las cuatro mutantes y *P. putida* KT2440 (Figura 18). Para las células no desecadas no hubo diferencia entre las cepas, se observó la mayoría de las células con fluorescencia de verde, es decir que la membrana se encontró íntegra. En contraste, después de la desecación-rehidratación de 20 minutos las células de *P. putida* KT2440 y las cepas Δ PP_3451, Δ PP_0880 y Δ PP_0256 se tiñeron de rojo indicando que las células sufrieron daño en la membrana, estos resultados concuerdan con la pérdida de la cultivabilidad de las cepas a los 18 DPID. Sin embargo, las células de la cepa Δ PP_1446 se observaron en su mayoría con fluorescencia roja y en menor proporción en color verde, este hallazgo coincide con la supervivencia de la cepa Δ PP_1446 18 DPID. Así que se sugiere que la preservación de la integridad de la membrana contribuye a la resistencia de la mutante Δ PP_1446.

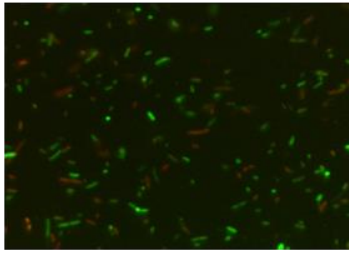
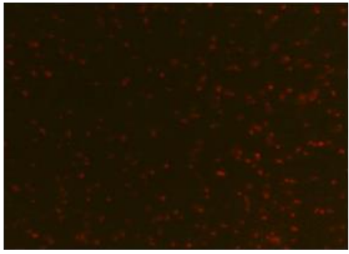
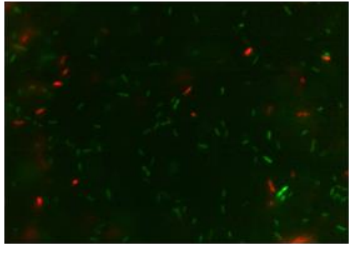
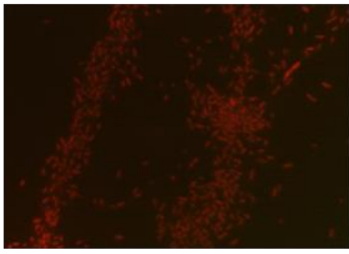
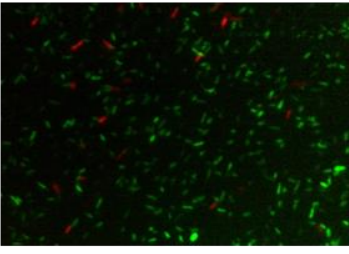
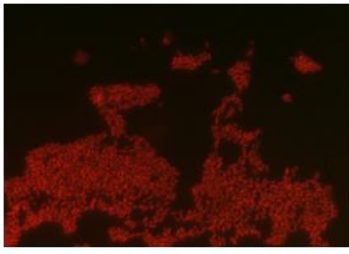
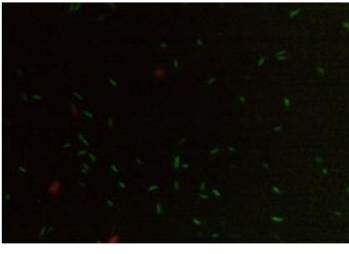
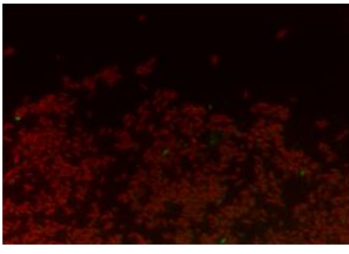
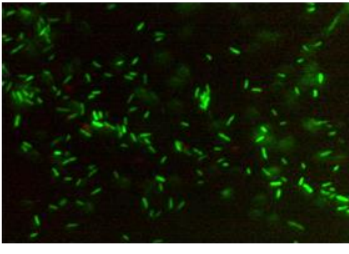
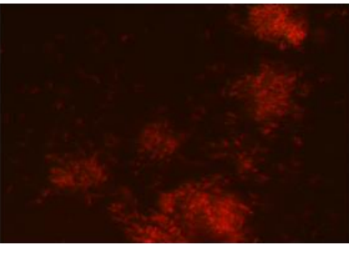
Cepa	Células no desecadas	Células desecadas-rehidratadas 20 min
WT		
ΔPP_{0256}		
ΔPP_{0880}		
ΔPP_{1446}		
ΔPP_{3451}		

Figura 18. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células no desecadas y desecadas-rehidratadas 20 minutos de *P. putida* KT2440 y las mutantes teñidas con el kit LIVE/DEAD



7.7 Genes diferencialmente expresados de células desecadas-rehidratadas 24 horas

El análisis de los resultados obtenidos de los microarreglos de las muestras de desecación-rehidratación prolongada produjo 191 genes diferencialmente expresados, 148 genes inducidos enlistados en la tabla 12 y 43 genes reprimidos ordenados en la tabla 13, a diferencia del experimento de rehidratación corta que se observaron sólo 6 genes diferencialmente expresados.

Tabla 12. Genes sobreexpresados para la condición de desecación-rehidratación de 24 horas en *P. putida* KT2440.

Genes sobreexpresados			
Locus	Gen	Nombre	Fold Change
PP_5407		Proteína de transposición TnsD-like	2.242
PP_5318	<i>ubiA</i>	4-hidroxibenzoato nonaprenil transferasa	2.215
PP_5311		Proteína de transducción de señal	2.149
PP_5297		Transportador de aminoácidos	4.183
PP_5295		Proteína hipotética	3.102
PP_5246	<i>kefB-III</i>	Proteína sistema de eflujo de potasio	2.087
PP_5237		Proteína hipotética	2.620
PP_5203	<i>fau</i>	5-formiltetrahidrofolato ciclo-ligasa	2.174
PP_5115		Proteína contiene dominio peptidasa M16	2.478
PP_5114		Adenina metiltransferasa, degradación de RNA	2.620
PP_5104		Tiazol sintasa	2.403
PP_5087	<i>rpmE</i>	50S proteína ribosomal L31	2.090
PP_5078	<i>aroB</i>	3-dehidroquinato sintasa	2.158
PP_5077		Proteína contiene dominio esporulación	2.281
PP_5069	<i>trxC</i>	Tiorredoxina	2.374
PP_5066	<i>cvrA</i>	Antiportador potasio/protón	2.602
PP_5054		Glutarredoxina 3	2.612
PP_5047	<i>ntrB</i>	Sistema sensor de doble componente sensor histidin cinasa/fosfatasa NtrB	2.146
PP_5017	<i>tatB</i>	Translocasa Sec-independiente	2.224
PP_5005	<i>phaC</i>	Poly (3-hidroxialcanoato) polimerasa 2	3.225
PP_5001	<i>hslU</i>	Proteasa ATP-dependiente subunidad unión-ATP HslU	6.239
PP_4960	<i>fda</i>	Fructosa bifosfato aldolasa	2.270
PP_4958	<i>ygjP</i>	Hidrolasa metal-dependiente	2.237
PP_4940		Glicosiltransferasa	2.419
PP_4921		Transportador de nucleósido NCS1	2.019
PP_4905		Proteína de motor flagelar MotA	3.512
PP_4901	<i>yicG</i>	Proteína de membrana interna	2.019



PP_4887		Proteína hipotética	3.803
PP_4857	<i>yhjG</i>	Proteína YhjG	2.147
PP_4853		Permeasa superfamilia DMT	2.031
PP_4802		Proteína reguladora de lipoato	2.125
PP_4782	<i>thiD</i>	Fosfometilpirimidina cinasa	2.749
PP_4754		Regulador transcripcional de la familia TetR	2.739
PP_4748		Transportador ABC aminoácidos proteína unión-sustrato	2.579
PP_4740	<i>hsdR</i>	Endonucleasa del sistema de modificación de restricción de tipo I	2.550
PP_4707		Proteína OmsY-like	2.110
PP_4674	<i>recC</i>	Multifuncional DNA helicasa ATP- dependiente/ dsDNA/ ssDNA exonucleasa/ ssDNA subunidad endonucleasa recombinasa (<i>recC</i>)	2.296
PP_4558		Acetiltransferasa familia GNAT	6.704
PP_4447		Proteína hipotética	2.627
PP_4427		Transportador ABC aminoácidos permeasa	3.153
PP_4361	<i>fliK</i>	Proteína flagelar de control de la longitud del gancho	2.241
PP_4216	<i>pvdE</i>	Transportador péptido cíclico	2.458
PP_4199		Lipoproteína	2.773
PP_4147	<i>yejA</i>	Transportador ABC de péptidos proteína de unión a sustrato	2.066
PP_4146		Transportador ABC péptido proteína de unión a sustrato	2.042
PP_4124	<i>nuoG</i>	NADH deshidrogenasa subunidad G	2.941
PP_4113		Proteína hipotética	2.366
PP_4104		Glutación S-transferasa	2.884
PP_4102		Proteína hipotética	2.698
PP_4078		Proteína hipotética	2.298
PP_4064	<i>ivd</i>	Isovaleril- CoA deshidrogenasa	2.519
PP_4027		Proteína hipotética	2.065
PP_3956		Proteína hipotética	2.027
PP_3948		Aldehído deshidrogenasa	2.020
PP_3940		Transportador de la familia facilitador mayor	2.036
PP_3925		Aminoglucósido fosfotransferasa	4.142
PP_3910		Proteína hipotética	2.042
PP_3813	<i>ribAB-II</i>	3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfate sintasa	2.348
PP_3768	<i>aroE</i>	Shikimate 5-deshidrogenasa	2.126
PP_3735		Transportador ABC proteína de unión-ATP	3.038
PP_3711		Diguanilato ciclasa	2.004
PP_3683		Proteína hipotética	2.183
PP_3678		Proteína hipotética	2.361
PP_3664	<i>pssA</i>	CDP-diacilglicerol serina O-fosfatidil transferasa	2.268



PP_3653		Transportador de aminoácidos LysE	2.978
PP_3587	<i>tpx</i>	Proteína con dominio redoxina	2.018
PP_3561		Portador de eflujo de auxina	2.429
PP_3512		Proteína con dominio de par transmembrana	2.221
PP_3494		Proteína hipotética	3.553
PP_3474		Proteína de ensamble de curli CsgE	3.199
PP_3422	<i>ltg</i>	Transglicosilase lítica	2.068
PP_3380	<i>ptxS</i>	Represor utilización 2- cetogluconato (ptxS)	2.696
PP_3355		Beta-cetotiolasa	2.591
PP_3346	<i>nikE</i>	Transportador de nickel proteína de unión-ATP Nike	2.144
PP_3340		Receptor de TonB-dependiente	2.369
PP_3337		Proteína de membrana	2.070
PP_3303		3-oxoacil-ACP sintasa	2.238
PP_3276	<i>phal</i>	Subunidad fenilacetato-CoA oxigenasa PaaI	2.533
PP_3275	<i>phaH</i>	Subunidad fenilacetato-CoA oxigenasa PaaJ	2.025
PP_3271	<i>phaK</i>	Porina específica de ácido fenilacético	2.107
PP_3270	<i>phaL</i>	Bifuncional aldehído deshidrogenasa/enoil-CoA hidratasa	2.249
PP_3146		Oxidorreductasa	2.437
PP_3134		Proteína transferasa hexapéptido	2.067
PP_3086		Factor sigma 70 RNA polimerasa	2.213
PP_2972		Proteína hipotética	2.489
PP_2966		Proteína hipotética	2.500
PP_2962		Zinc- alcohol deshidrogenasa	2.064
PP_2951		Regulador transcripcional de la familia TetR	5.755
PP_2922		Urea amidoliasa proteína like	2.558
PP_2880		Proteína like urea amidoliasa	2.029
PP_2869		NADH flavín oxidorreductasa	2.038
PP_2756		Proteína hipotética	2.197
PP_2676	<i>pedG</i>	Proteína de unión a sustrato	2.342
PP_2664	<i>pedS1</i>	Sistema sensor doble componente histidin cinasa/regulador de respuesta	2.226
PP_2622		Proteína hipotética	2.371
PP_2652		Hidratasa/descarboxilasa	3.552
PP_2651		Transportador de familia mayor facilitador	2.695
PP_2638		Subunidad celulosa sintasa BcsC	2.520
PP_2631		Proteína biosíntesis de celulosa BcsF/YhjT	2.250
PP_2603		Xilosa isomerasa	2.136
PP_2573		Glioxalasa/proteína de resistencia a bleomicina/dioxigenasa	2.102
PP_2530		Proteína hipotética	3.025



PP_2507		Deshidrogenasa cadena corta/reductasa oxidorreductasa	2.431
PP_2506		Proteína de membrana	2.871
PP_2498		Proteína hipotética	2.315
PP_2492	<i>yqhD</i>	Alcohol deshidrogenasa NAD(P)-dependiente	2.936
PP_2476		Zinc alcohol deshidrogenasa	3.174
PP_2475		Regulador transcripcional de la familia TetR	2.587
PP_2455	<i>rbsA</i>	Transportador ABC ribosa proteína de unión-ATP	2.098
PP_2386		Proteína hipotética	2.039
PP_2376	<i>cti</i>	Isomerasa cis/trans ácidos grasos	2.006
PP_2256		Regulador transcripcional de la familia Cro/CI	2.194
PP_2253		Regulador transcripcional de la familia GntR	2.121
PP_2250		Regulador transcripcional de la familia LysR	3.088
PP_2222		Proteína hipotética	2.145
PP_2209	<i>phnW</i>	2-amino etil fosfonato-piruvato transaminasa	2.487
PP_2208	<i>phnX</i>	Fosfonoacetaldehído hidrolasa	2.578
PP_2104		Proteína de membrana	2.455
PP_2072		Regulador transcripcional de la familia AraC	2.127
PP_2067		Transportador de la familia de resistencia a dogras EmrB/QacA	2.112
PP_1890		Chaperona de ensamble del pili	2.246
PP_1870	<i>tpm</i>	Tiopurina S-metiltransferasa	2.597
PP_1834		Proteína con dominio anquirina	2.587
PP_1817		Deshidrogenasa de cadena corta	2.004
PP_1776		Manosa-6-fosfato isomerasa	2.168
PP_1748		Proteína hipotética	2.771
PP_1712		Proteína hipotética	2.151
PP_1662		Proteína hipotética	2.883
PP_1377	<i>pcaF</i>	Beta-cetoacil CoA tiasa	2.386
PP_1376	<i>pcaK</i>	Transporte de benzoato	2.238
PP_1349	<i>pduO</i>	Corrinoide adenosiltransferasa PduO	2.588
PP_1103		DEAD/DEAH box helicasa	2.853
PP_1188	<i>dctA</i>	Transportador C4-dicarboxilato DctA	2.045
PP_1156		Transportador formato/nitrato	2.339
PP_0991		Proteína hipotética	2.185
PP_0981		Proteína hipotética	2.548
PP_0919		Proteína hipotética	2.703
PP_0700		Factor sigma FecR anti-FecI	2.356
PP_0671	<i>glyA</i>	Serina hidroximetil transferasa	2.625
PP_0668		Sensor de transmembrana 15 FecR- like	2.068
PP_0651		Acetiltransferasa	3.486
PP_0574		Regulador transcripcional de la familia LuxR	2.725
PP_0570		Alfa-2-macroglobulina	2.166



PP_0514	<i>ribD</i>	Proteína de biosíntesis de riboflavín RibD	2.463
PP_0512		Proteína hipotética	3.375
PP_0277		Proteína hipotética	3.037
PP_0204		Regulador transcripcional de la familia GntR	2.126
PP_0175		Regulador transcripcional de la familia MarR	2.332
PP_0134		Proteína asociada a transporte	5.706
PP_0090		Proteína hipotética	3.081

Tabla 13. Genes reprimidos para la condición de desecación-rehidratación de 24 horas en *P. putida* KT2440.

Genes reprimidos			
Locus	Gen	Nombre	Fold Change
PP_5183		Glutamina sintetasa	-3.624
PP_4917	<i>pde</i>	3', 5'fosfodiesterasa nucleótido cíclico	-2.352
PP_4897		N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa	-3.043
PP_4709	<i>rpsO</i>	30S proteína ribosomal S15	-9.425
PP_4594		Cistationina gamma-liasa	-5.172
PP_4562		Proteína hipotética	-3.894
PP_4557		Proteína hipotética	-2.069
PP_4385	<i>flgG</i>	Proteína de cuerpo basal flagelar FlgG	-4.854
PP_4370	<i>fliE</i>	Proteína de cuerpo basal de gancho flagelar FliE	-4.770
PP_4258	<i>ccoP-2</i>	Cbb3-2 citocromo c oxidasa subunidad P	-3.404
PP_4000	<i>serS</i>	Seril-tRNA sintetasa	-2.640
PP_3991		Proteína hipotética	-2.641
PP_3839	<i>adhA</i>	Alcohol deshidrogenasa	-5.885
PP_3820		Maturasa que codifica el intrón del grupo II	-3.038
PP_3433	<i>hpd</i>	4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa	-6.798
PP_2697		Proteína con dominio flavín reductasa	-2.119
PP_2695		Regulador transcripcional de la familia LysR	-3.828
PP_2693		Dipeptidasa	-2.904
PP_2647		Transportador de la familia facilitador mayor	-4.863
PP_2645	<i>mgtB</i>	ATPasa de tipo P translocación de magnesio	-3.069
PP_2467	<i>rpmI</i>	50S proteína ribosomal L35	-4.956
PP_2395		Proteína con repetidos ricos en leucina	-4.398
PP_2377		Aciltransferasa	-2.092
PP_2322	<i>oprI</i>	Lipoproteína de membrana externa OprI	-7.896
PP_2160	<i>queF</i>	7-ciano-7-azaguanina reductasa	-5.061
PP_2132		Proteína de estrés universal	-2.197
PP_2089	<i>oprF</i>	Proteína de la familia OmpF	-4.112
PP_1914	<i>fabG</i>	3-cetoacil-ACP reductasa	-2.289



PP_1840		Proteína hipotética	-2.050
PP_1773	<i>ihfB</i>	Factor de integración subunidad beta	-2.382
PP_1646		Alquil hidroperóxido reductasa	-2.104
PP_1522	<i>cspA-1</i>	Proteína Cold shock CspA	-2.095
PP_1503		Proteína hipotética	-2.913
PP_1185	<i>oprH</i>	Proteína de membrana externa H1	-7.928
PP_1100	<i>dcd</i>	Deoxicitidina trifosfato deaminasa	-7.430
PP_1071	<i>gltI</i>	Transportador ABC Glutamato/aspartato proteína de unión a sustrato	-2.386
PP_0459	<i>rplV</i>	50S proteína ribosomal L22	-5.770
PP_0454	<i>rplC</i>	50S proteína ribosomal L3	-5.951
PP_0446	<i>rplL</i>	50S proteína ribosomal L7/L12	-4.658
PP_0387	<i>rpoD</i>	Factor sigma RNA polimerasa RpoD	-3.115
PP_0201		Protil-tRNA sintetasa	-5.483
PP_0023		Proteína hipotética	-3.535

7.8 Clasificación funcional de los genes diferencialmente expresados en la rehidratación de 24 horas

Para determinar la posible función de los genes diferencialmente expresados durante la desecación-rehidratación prolongada se realizó la clasificación ontológica para la categoría de proceso biológico de los 191 genes. La búsqueda de los términos GO se realizó en la base de datos de *Pseudomonas* database y Biocyc. De los 148 genes inducidos se logró obtener el 57% de los términos GO y 43% no se determinaron (Figura 19). Mientras que, para los 43 genes reprimidos se logró clasificar el 77% de los genes y 23% no se determinaron (Figura 23).

7.8.1 Genes sobreexpresados

Los genes regulados positivamente durante la desecación-rehidratación 24 h con mayor representación en la ontología de procesos biológicos se encuentran relacionados con proceso de transporte, óxido-reducción, regulación de la transcripción y procesos biosintéticos (Figura 19).

Proceso biológico: Genes sobreexpresados

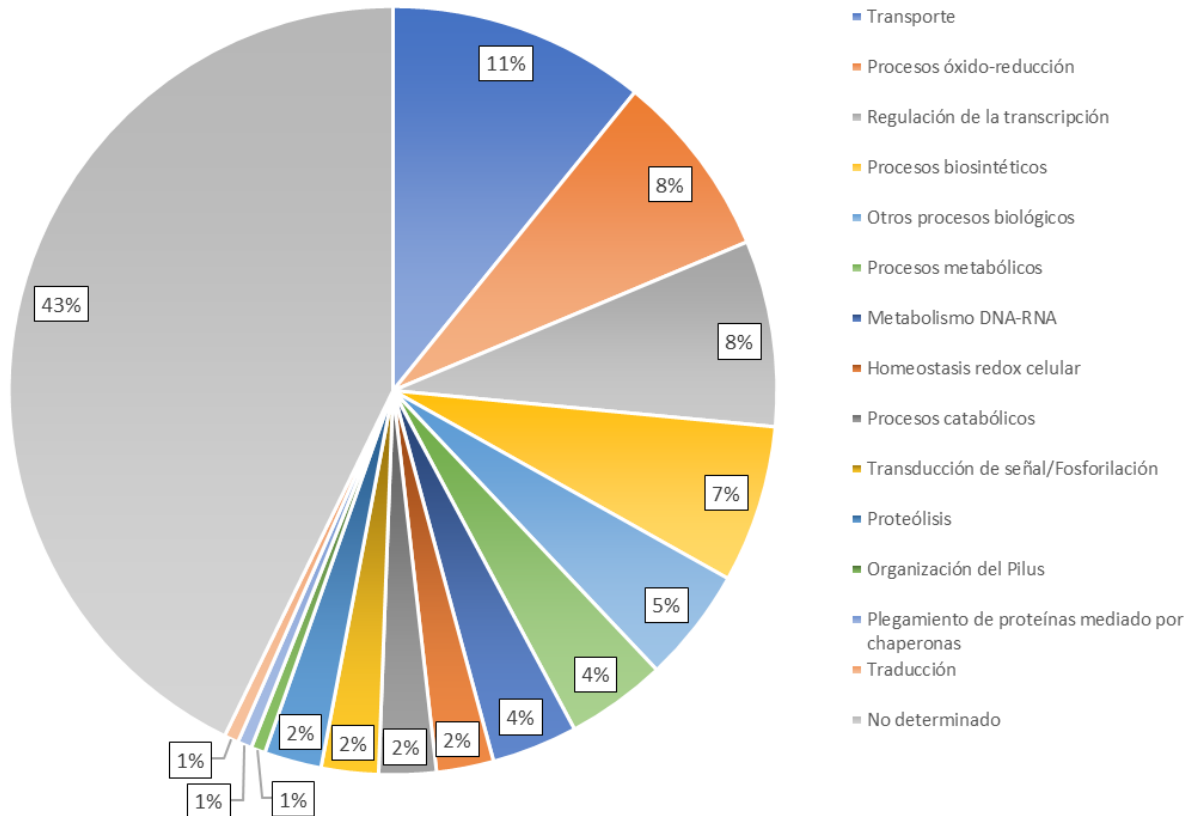


Figura 19. Clasificación ontológica correspondiente a la categoría de proceso biológico para los genes sobreexpresados en bacterias desecadas-rehidratadas 24 horas.

○ Genes participantes en los procesos de transporte

El 11% del total de los genes clasificados se encuentran relacionados con procesos de transporte, es interesante que la mayoría de estos genes participan en el transporte de aminoácidos, por ejemplo, los genes PP_5297 transportador de aminoácidos, PP_4427 transportador ABC de aminoácidos permeasa, PP_4147 proteína de unión a sustrato transportador ABC de péptidos, PP_4146 proteína de unión a sustrato transportador ABC de péptidos y PP_3653 transportador de aminoácidos LysE. Otros genes sobreexpresados con función de transporte fueron: PP_4216 transportador de péptidos cíclico, PP_3561 transportador de eflujo de auxina, PP_2651 transportador de resistencia a fármacos de la familia EmrB/QacA y PP_0134 proteína asociada a transporte. La



expresión de estos genes responde al estado nutricional de la célula, puesto que se inicia el intercambio intra y extracelular de sustancias, primordialmente captación de nutrientes y expulsión de compuesto tóxicos.

- **Genes involucrados en los procesos óxido-reducción**

El total de los genes regulados positivamente que se encuentran involucrados en procesos de óxido- reducción corresponde al 8%, el grupo se conforma entre otros por oxidorreductasas que participan en diversas rutas metabólicas, ejemplo de estos genes son PP_4064 Isovaleril-CoA y PP_3768 shikimato 5-deshidrogenasa (Figura 21) e intervienen en el catabolismo de la leucina, valina e isoleucina y biosíntesis de tirosina y triptófano, respectivamente. La síntesis de aminoácidos puede ser una estrategia de síntesis de solutos compatibles para mantener la osmorregulación celular, mientras que el catabolismo de aminoácidos podría ser fuente de nutrientes para la célula por falta de nutrientes en el medio. La sobreexpresión genes que codifican para proteínas antioxidantes que comparten el grupo con los procesos de homeostasis celular, estos genes son: PP_5054 glutarredoxina, PP_3587 proteína con dominio redoxina y PP_5069 tiorredoxina, su función posiblemente sea el disminuir el estrés oxidativo en la célula. Otros genes participantes en los procesos de óxido-reducción son: PP_5066 Antiportador potasio/protón (*cvrA*), PP_4124 NADH deshidrogenasa subunidad G y PP_2492 alcohol deshidrogenasa NAD(P)-dependiente.

- **Genes con función de regulación de la transcripción**

El tercer grupo de la clasificación funcional de los genes sobreexpresados en la rehidratación de 24 horas son los procesos de regulación de la transcripción con el 8% del total de los genes. En este grupo se distinguen los reguladores pertenecientes a la familia TetR, ya que ocupan la mayoría de los genes clasificados en el grupo y son: PP_4754 regulador transcripcional de la familia TetR, PP_2951 regulador transcripcional de la familia TetR, PP_2880 regulador transcripcional de la familia TetR y PP_2475 regulador transcripcional de la familia TetR. Otros genes con posible función de regulación de la transcripción son PP_2253 regulador transcripcional de la familia GntR, PP_2250 regulador transcripcional de la familia LyrR, PP_2072 regulador transcripcional



de la familia AraC y PP_0175 regulador transcripcional de la familia MarR. El cambio de un estado de dormancia donde la expresión de genes se disminuye, a un estado cultivable requiere de la acción de numerosos reguladores transcripcionales encargados de controlar diversos procesos celulares.

- **Genes involucrados en procesos biosintéticos**

El 7% de los transcritos sobreexpresados participan en procesos de biosíntesis, entre los procesos se encuentra la biosíntesis de aminoácidos, celulosa y lípidos. Los genes que actúan en la síntesis de los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano son PP_5078 3-dehidroquinato-synthase (*aroB*) y PP_3768 Shikimato 5-hidrogenasa (*aroE*) (Figura 21). Los genes PP_3664 CDP- diacilglicerol O-fosfatidil transferasa (*pssA*) y PP_0671 serina hidroximetil transferasa (*glyA*) participan en la síntesis de los aminoácidos glicina, serina y treonina (Figura 23), el incremento de la biosíntesis de aminoácidos podría estar ligado a la acumulación de solutos compatibles. Mientras que el gen PP_2638 celulosa sintasa subunidad BcsC actúa en la síntesis de celulosa y el gen PP_3303 3-oxoacil-ACP sintasa en la síntesis de ácidos grasos, sugiriendo el cambio de la composición de los lípidos de membrana y la síntesis de exopolisacáridos.

BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS

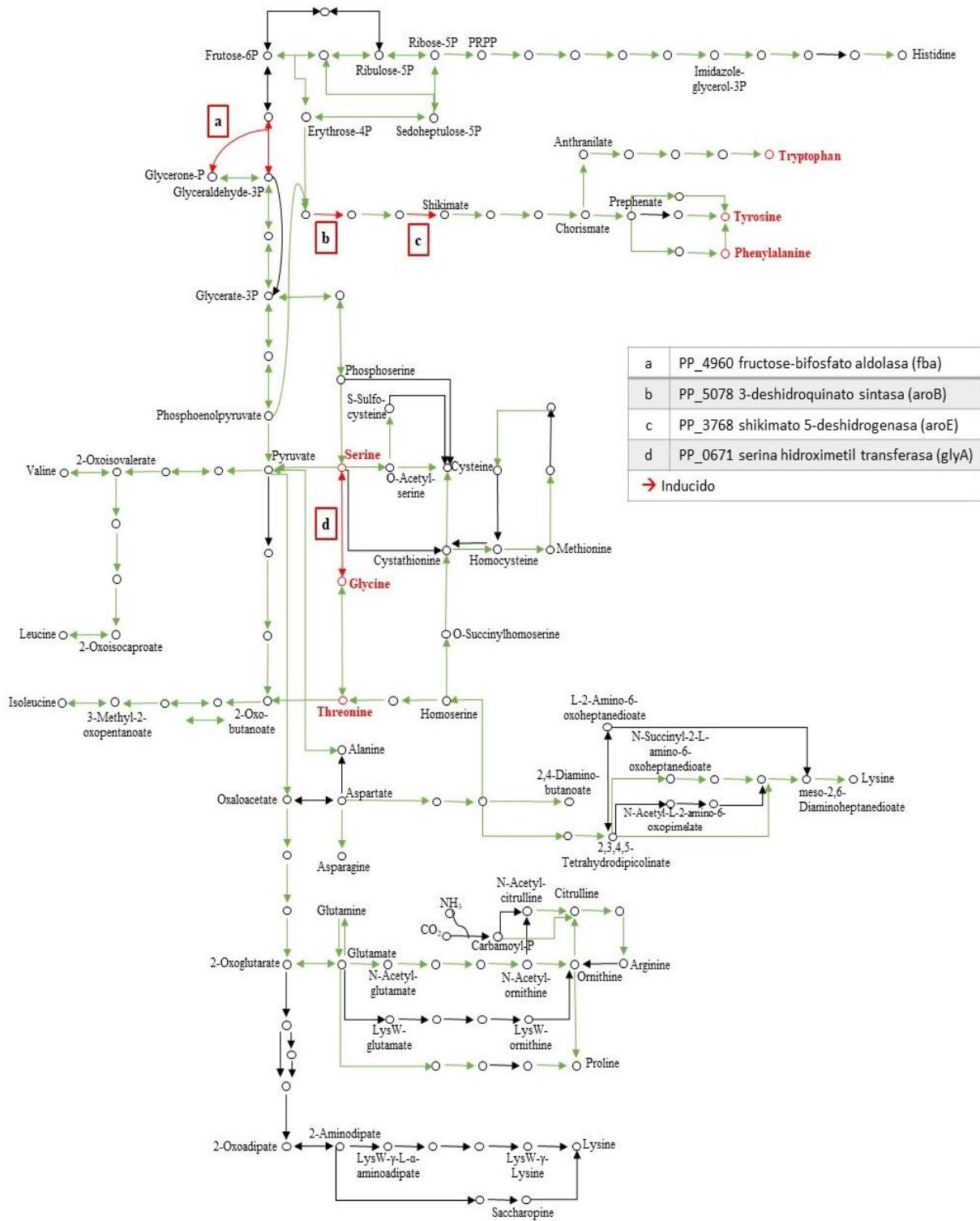


Figura 20. Genes sobreexpresados en la biosíntesis de los aminoácidos tirosina, triptófano, fenilalanina, serina, glicina y treonina.

METABOLISMO DE LA FENILALANINA

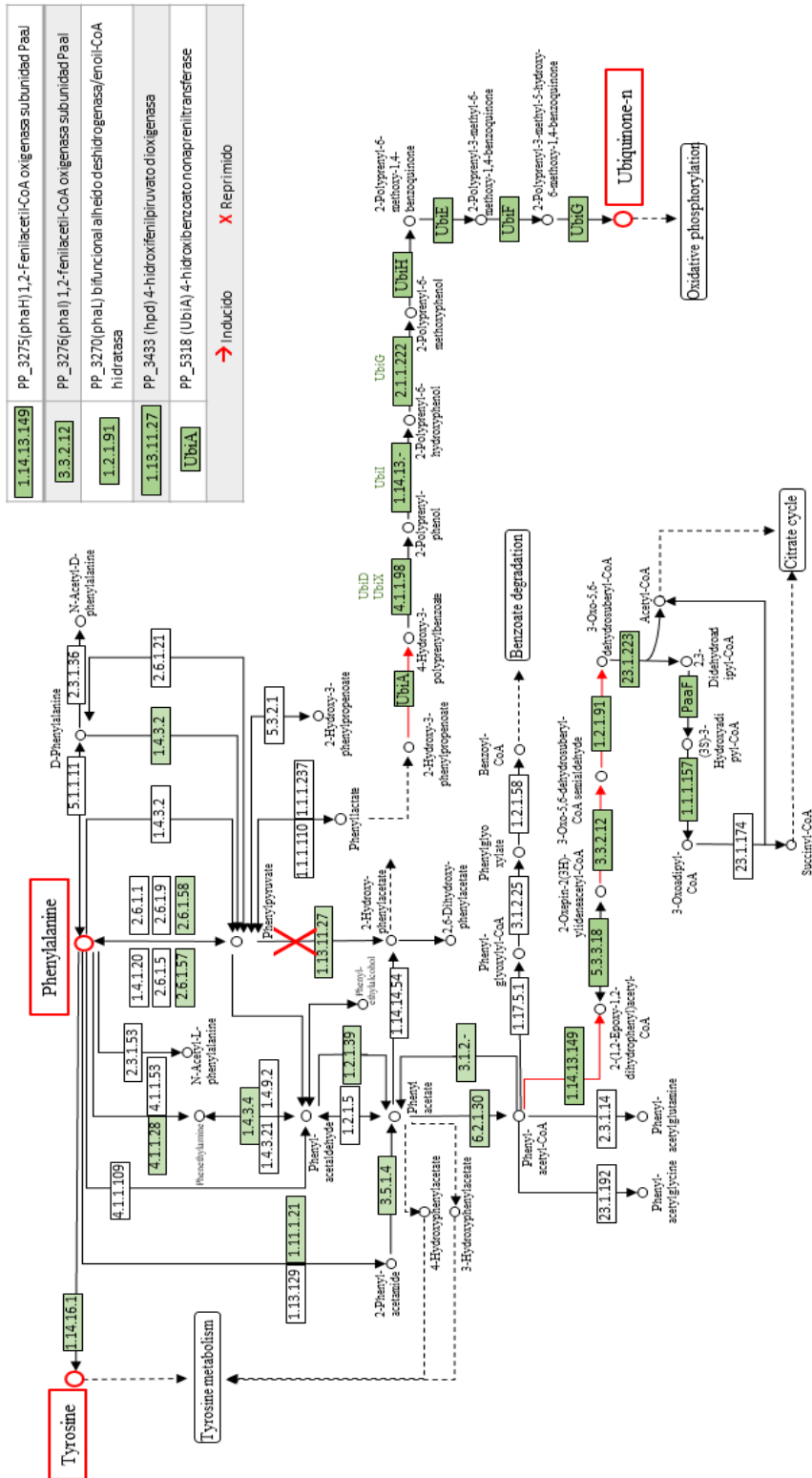


Figura 21. Genes diferencialmente expresados en el catabolismo de la fenilalanina.

METABOLISMO GLICINA, SERINA Y TREONINA

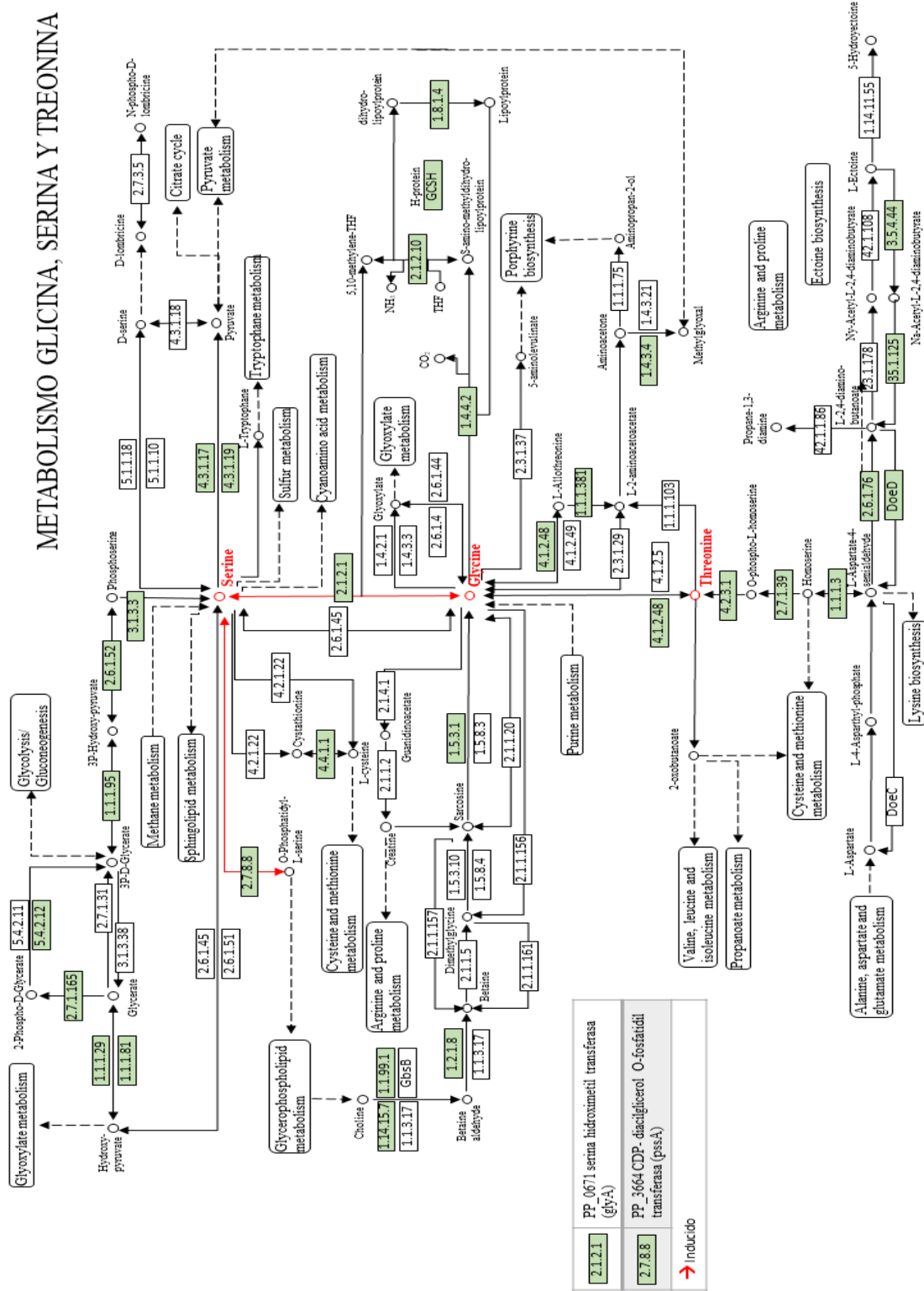


Figura 22. Genes sobreexpresados en la biosíntesis de serina, glicina y treonina.

7.8.2 Genes reprimidos

Los genes regulados negativamente con mayor representación en la ontología de procesos biológicos se encuentran relacionados con procesos de traducción, óxido-reducción, regulación de la transcripción (Figura 23).

Proceso biológico: Genes reprimidos

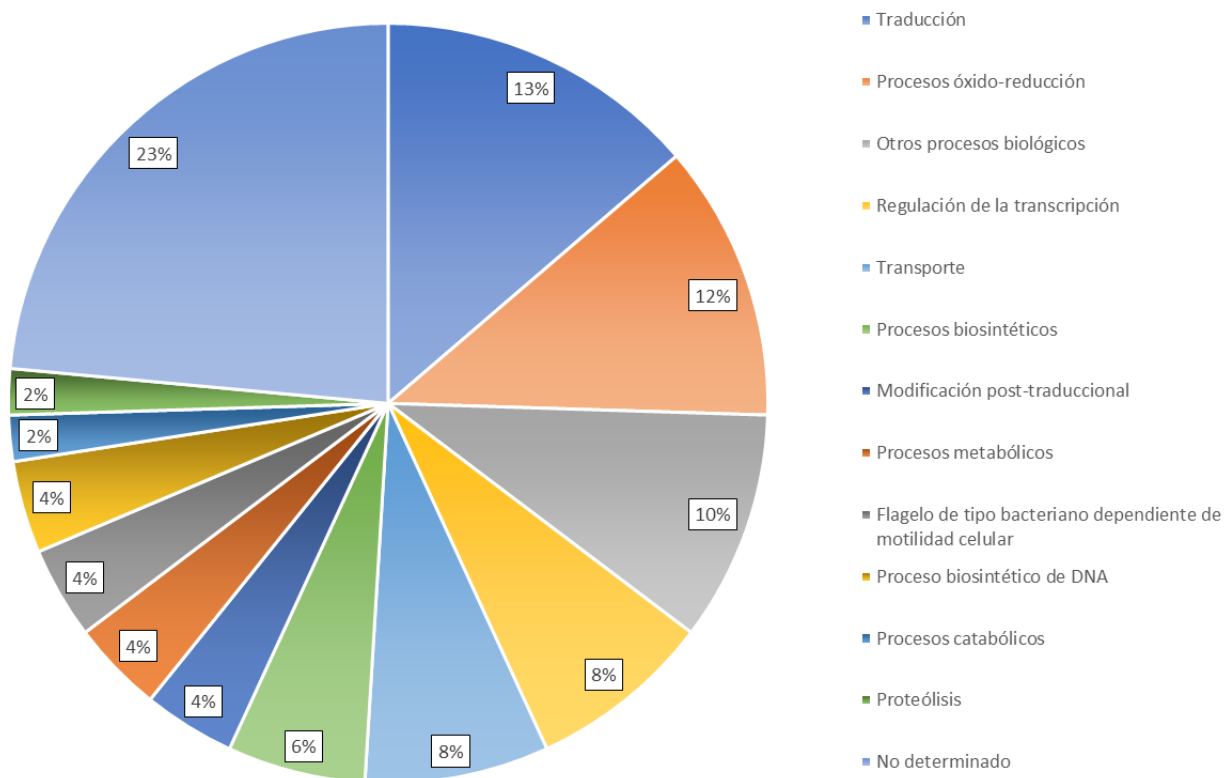


Figura 23. Clasificación ontológica correspondiente a la categoría de proceso biológico para los genes reprimidos de las células desecadas-rehidratadas 24 horas.

○ Genes del proceso de traducción

De acuerdo con la clasificación de los términos GO de los genes reprimidos, el grupo con mayor número de genes es el proceso de traducción con 13%. Algunos genes presentes en el grupo son: PP_4709 30S proteína ribosomal S15, PP_0459 50S proteína ribosomal L22, PP_0454 50S proteína ribosomal L3, PP_0446 50S proteína ribosomal L7/L12 y PP_4000 ligasa de serina-tRNA, la represión de estos genes implica la disminución de la



traducción y el uso de traducción específica durante la rehidratación de 24 h y retorno del estado VBNC.

- **Genes del proceso de óxido-reducción**

Por otra parte, los procesos de óxido-reducción fue el segundo grupo con mayor cantidad de genes reprimidos, representó el 12% de los genes clasificados. Los genes PP_1914, 3-cetoacil-ACP reductasa, PP_3839 alcohol deshidrogenasa, PP_3433 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (Figura 21) y PP_4258 Cbb3-2 citocromo c oxidasa subunidad P, codifican para oxidorreductasas participantes en diversas rutas metabólicas, por ejemplo, PP_3433 participante en el metabolismo de la fenilalanina fue regulado negativamente.

- **Genes relacionados con la regulación de la transcripción**

El tercer proceso con la mayoría de transcritos regulados negativamente fue la categoría de regulación de la transcripción con 8% del total de los genes, resaltan los genes PP_1522 Cold shock protein CspA y PP_0387 RNA polimerasa factor sigma RpoD. El factor sigma (*rpoD*), esencial en el crecimiento exponencial fue reprimido, coincide con el estado “dormido” de las células ya que durante la rehidratación no hay nutrientes disponibles en el medio y por lo tanto no hay crecimiento de células.



IX. DISCUSIÓN

P. putida KT2440 es una bacteria metabólicamente versátil, por sus características promotoras del crecimiento vegetal es considerada una PGPB con potencial agrobiotecnológico (Molina-Romero *et al.*, 2017). No obstante, es poco tolerante a la desecación, condición que limita su uso en inoculantes microbianos, debido a que las cepas que conforman los consorcios bacterianos deben ser capaces de tolerar condiciones adversas, como lo es la baja disponibilidad de agua. Interesantemente, se ha descrito que en condiciones de desecación *P. putida* KT2440 utiliza el estado VBNC como estrategia de supervivencia (Pazos-Rojas *et al.*, 2019), pese a estos hallazgos, los genes involucrados en la entrada al estado VBNC, permanencia y el retorno cultivable no sean han explorado para *P. putida* KT2440. En el presente estudio se realizó la búsqueda de los genes potencialmente involucrados en el retorno del estado VBNC en células desecadas-rehidratadas de *P. putida* KT2440.

Se exploró la supervivencia de *P. putida* KT2440 a desecación-rehidratación 20 min, los resultados indicaron que ésta disminuye posterior a 15 DPID, el conteo de UFC/mL y BSR desciende a cero y continua así hasta los 18 DPID, estos resultados confirman que *P. putida* KT2440 es poco tolerante a la desecación. Interesantemente, posterior a la rehidratación prolongada el conteo de UFC/mL incrementa a 10^3 UFC/mL, sugiriendo así que la bacteria utiliza el estado viable no cultivable (VBNC) como estrategia de supervivencia ante el estrés por desecación, mientras que el retorno del estado cultivable ocurre al rehidratar las células por un período prolongado. En numerosos estudios se ha reportado que las células retornan de la dormancia o estado VBNC al remover el factor estresante: pH, inanición, temperatura, desecación, estrés oxidativo y estrés osmótico (Ding *et al.*, 2017; Dong *et al.*, 2020; Pazos-Rojas *et al.*, 2019; Zhong *et al.*, 2019) o por la acción de un estímulo del entorno, por ejemplo aminoácidos (Dong *et al.*, 2020). Con la finalidad de determinar los genes involucrados en el proceso rehidratación y retorno del estado VBNC, se analizó el transcriptoma de *P. putida* KT2440 en condiciones de desecación-rehidratación 20 minutos y desecación-rehidratación 24 horas, ambas condiciones se compararon con el transcriptoma de células no desecadas (AD).



El análisis del perfil transcriptómico por microarreglos de las células de *P. putida* KT2440 desecadas-rehidratadas por 20 minutos señaló 6 genes diferencialmente expresados, no obstante, al realizar la validación por RT-qPCR se encontró que sólo 5 de estos genes se inducen en condiciones de rehidratación corta (PP_2676, PP_2662, PP_3451, PP_1446 y PP_0256). Asimismo, se determinó por RT-qPCR que los 5 genes se inducen en células desecadas 18 días sin hidratar, este hallazgo resalta la probable participación de estos genes en el proceso de mantenimiento del estado VBNC y el retorno al estado cultivable.

El gen PP_2676 codifica para una proteína putativa de unión a periplasma (*pedG*) y el gen PP_2662 para una porina, ambos genes se encuentran organizados en un cluster (PP_2662-PP_2680) regulado por *pdeR1* (PP_2665), se ha reportado que el cluster codifica para diversos transportadores ABC que participan en el intercambio de diferentes sustancias y compuestos tóxicos (Dos Santos *et al.*, 2004). En *P. putida* KT2440 se ha reportado que ambos genes se encuentran involucrados en el metabolismo de alcoholes de cadena media y polioles, tal es el caso de n-butanol (Vallon *et al.*, 2015), glicerol (Nikel *et al.*, 2014) y etilenglicol (Li *et al.*, 2019). Por otra parte, el gen PP_2676 cuenta con un dominio de unión a penicilina (PBP) y se induce en respuesta a niveles letales de cloranfenicol (Fernández *et al.*, 2012) e imipenem (Bojanovic *et al.*, 2017). Además, se ha encontrado que el gen PP_2676 participa en la tolerancia a naftaleno y otros compuestos que producen estrés oxidativo (Fernández *et al.*, 2012). El papel que desempeñan los genes PP_2676 y PP_2662 en este estudio apunta a la participación en el intercambio y degradación de polioles almacenados como solutos compatibles durante el estrés por desecación, además de la expulsión de compuestos tóxicos. Interesantemente, el gen PP_2676 fue el único de los 6 genes que se sobreexpresó en todas las condiciones analizadas por RT-qPCR (células desecadas, desecadas-rehidratadas 20 min y desecadas-rehidratadas 24 horas) y microarreglos (células desecadas-rehidratadas 20 min y desecadas-rehidratadas 24 horas), por lo tanto, su participación podría ser fundamental en el retorno del estado VBNC. Desafortunadamente, las mutantes Δ PP_2676 y Δ PP_2662 no se encontraron



disponibles para analizar el comportamiento de estas cepas en condiciones de desecación.

El gen PP_0256 codifica para una oxidorreductasa putativa (subunidad α de molibdopterina); las enzimas que utilizan al molibdeno como cofactor participan en la transferencia de protones en diversas reacciones redox intracelulares y en el metabolismo de carbono, nitrógeno y azufre (Lobbi-Nivol and Leimkühler 2013; Xia *et al.*, 2018). En *P. putida* se ha reportado la participación del sistema de transporte de molibdeno ModABC en la degradación de nicotina (Xia *et al.*, 2018). En *E. coli* el gen *yedY* codifica para la oxidorreductasa-molibdopterina que forma parte del sistema enzimático MsrPQ encargado de reparar proteínas que contienen sulfóxido de metionina, un daño provocado por especies reactivas de oxígeno y cloro (Gennaris *et al.*, 2015). En los ensayos por RT-qPCR se observó la disminución de los niveles de expresión del gen PP_0256 con respecto al tiempo de rehidratación, mientras que para las células desecadas no hidratadas el nivel de expresión fue aún mayor. Este comportamiento podría sugerir que el gen PP_0256 se encuentra más activo durante el estado VBNC contrarrestando el daño ocasionado por los ROS producto del estrés inducido por la desecación y en medida que las células retornaron al estado cultivable su expresión fue disminuyendo. La mutación en el gen PP_0256 no causó cambios en el comportamiento de la bacteria durante el proceso de desecación-rehidratación.

El gen PP_0880 codifica para el transportador ABC de dipéptidos permeasa se expresó diferencialmente en los ensayos de microarreglos, sin embargo, cuando se realizó la validación por RT-qPCR no presentó cambios en ninguna de las condiciones analizadas.

El gen PP_3451 es una proteína hipotética de función desconocida, de acuerdo con los ensayos de RT-qPCR solo presenta cambios significativos posterior a desecación-rehidratación 24 horas. Será interesante continuar con los análisis correspondientes para determinar su función.



El gen PP_1446 codifica para un receptor de TonB. Los receptores dependientes de TonB participan en el transporte a través de la membrana, se ubican en la membrana externa y utilizan la energía protón-motriz generada por el complejo TonB-ExbB-ExbD (sistema TonB) que se encuentra en la membrana interna. La limitación de nutrientes experimentada por las células de *P. putida* KT2440 durante los 18 días de desecación pudo haber desencadenado la respuesta estricta y por lo tanto el incremento de la poza de (p)ppGpp, un regulador positivo de los transportadores dependientes de TonB, esencial para la captación de sideróforos, hierro, vitamina B12, quelatos de níquel y carbohidratos (Fujita *et al.*, 2019; Hauryliuk *et al.*, 2015; Menikpurage *et al.*, 2019; Noinaj *et al.*, 2010; Yanan *et al.*, 2019). La eliminación del agua durante la desecación provoca la oxidación del hierro de las proteínas (Labrude, Chaillot, & Vigneron, 1987) así que las células desecadas posiblemente activan el receptor dependiente de TonB (PP_1446) para importar el hierro. Estudios en otras bacterias han revelado que durante el estado de dormancia las células activan la transcripción de genes que codifican para proteínas antioxidantes y de transporte de hierro. En un análisis transcripcional de *V. cholerae* en estado VBNC se identificó la sobreexpresión de un sistema de transporte de hierro (iron (III) ABC transporter) sugiriendo así que la adquisición de hierro es importante para la supervivencia de la bacteria (Asakura *et al.*, 2007; Payne *et al.*, 2016). De la misma forma en análisis del transcriptoma de *Vibrio parahaemolyticus* durante el estado VBNC cuatro transportadores de hierro fueron regulados positivamente (Meng *et al.*, 2015). Se ha reportado que los receptores dependientes de TonB participan en la captación de nutrientes esenciales incluyendo el hierro, indispensable para la formación de la biopelícula (Gúlez *et al.*, 2014; Pasquale, 2019). Además, se ha sugerido que el hierro se encuentra involucrado en la resucitación del estado VBNC de *Salmonella enterica* cuando el medio es complementado con ferrioxamina E, posiblemente la ferrioxamina modula la liberación y uso de hierro evitando que se generen ROS (Reissbrodt *et al.*, 2002). Es posible que las células desecadas acumulan niveles elevados de ROS que oxidan el cofactor catalítico Fe(II) de numerosas enzimas no redox alterando el metabolismo, en respuesta las bacterias activan la importación de hierro para restaurar la actividad de las enzimas y preservar las funciones celulares (Puig *et al.*, 2017). Por lo tanto, la regulación positiva del gen PP_1446 observado en el presente estudio podría

ser una estrategia utilizada por *P. putida* KT2440 para obtener hierro requerido para llevar a cabo las funciones vitales durante el estado VBNC. Interesantemente, la mutante Δ PP_1446 fue más resistente que la cepa parental, posiblemente la escasa cantidad de hierro intracelular acumulado en las células mutantes podría haber disminuido la catalización de las reacciones de Fenton y limitar el daño ocasionado por los ROS durante la desecación (Touati, 2000). No obstante, es necesario realizar más estudios sobre la cepa Δ PP_1446 para comprender su comportamiento durante la desecación.

En la figura 24 se resume la ubicación y la participación de los seis genes diferencialmente expresados durante el proceso de desecación-rehidratación de 20 minutos.

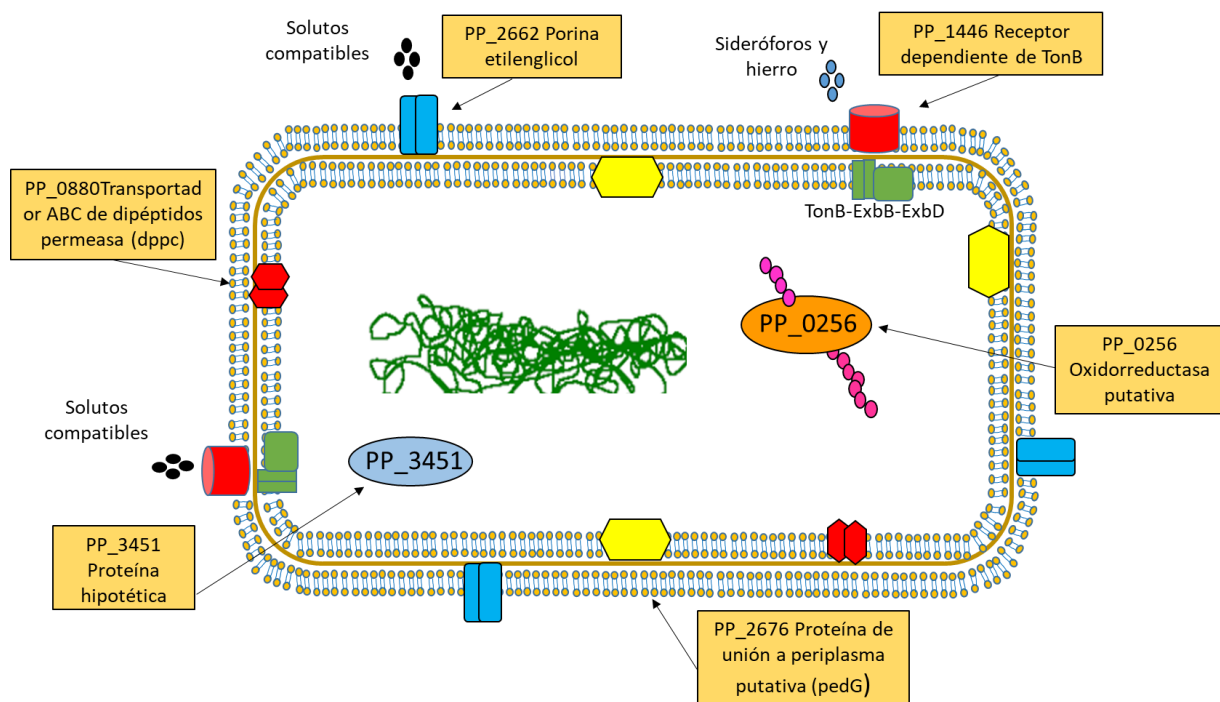


Figura 24. Ubicación y función de los genes diferencialmente expresados en los ensayos de desecación-rehidratación de 20 minutos.

A diferencia de los resultados obtenidos de las células desecadas-rehidratadas 20 minutos en los ensayos de desecación-rehidratación de 24 horas se observó un mayor número de genes diferencialmente expresados. Los procesos de transporte, óxido-reducción, regulación de la transcripción y procesos biosintéticos obtuvieron el mayor



porcentaje de los genes inducidos, estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios donde se limita el agua a *Pseudomonas*. Las categorías de transporte y proteínas de unión, metabolismo energético y transcripción fueron los procesos con mayor número de genes sobreexpresados en un estudio donde se sometió a *P. putida* KT2440 a estrés hídrico durante 24 horas (Gúlez et al., 2012). En otro estudio se estableció que genes involucrados en el metabolismo y transporte de aminoácidos, transporte y estrés oxidativo desempeñan una función importante en la adaptación y supervivencia de *P. putida* a condiciones de bajo contenido de agua (Van De Mortel and Halverson, 2004).

El grupo con mayor abundancia de genes de la categoría de proceso biológico fueron los procesos de transporte, dentro del grupo destacan los genes involucrados en el transporte de aminoácidos (PP_5297, PP_4427, PP_4147, PP_4146 y PP_3653). Durante la rehidratación prolongada con agua las células se someten a estrés hídrico y estrés por limitación de nutrientes, en consecuencia, se inicia el intercambio de osmolitos y nutrientes para mantener la supervivencia celular. Se ha reportado que la acumulación de solutos compatibles es una estrategia utilizada por las bacterias para mantener la osmolaridad celular, algunos de los osmolitos reportados son polioles, aminoácidos, aminoácidos derivados y péptidos (Kurz, Buren, Seip, Lindow, & Gross, 2010). *P. fluorescens* MSP-393 bajo ambientes altamente salinos acumula los aminoácidos alanina, glicina, ácido glutámico, serina, treonina y aspartato como estrategia de resistencia (Paul and Nair, 2008). Estos pueden ser sintetizados *de novo* o bien ser captados del ambiente para reducir el gasto de energía (Kurz et al., 2010). *Bacillus subtilis* induce sistemas de transporte de osmolitos como prolina y glicina betaína para compensar el balance osmótico de la membrana y estabilizar la presión de turgencia ante el estrés osmótico, los osmolitos son captados de los exudados de raíces, material vegetal en descomposición o células microbianas muertas (Empadinhas and Da Costa, 2008; Zaprasis et al., 2015). Por otra parte, la captación de aminoácidos es un mecanismo de resucitación utilizado por *Escherichia coli*, esta responde al estímulo de algunos aminoácidos presentes en el medio (leucina, glutamina, metionina y treonina) para iniciar el retorno del estado VBNC (Pienaar et al., 2016; Pinto et al., 2011). Otros



transportadores que también fueron regulados positivamente son: PP_4216 transportador de péptido cíclico, PP_3561 transportador de eflujo de auxina, PP_2651 transportador de resistencia a fármacos de la familia EmrB / QacA, PP_0134 proteína asociada a transporte, posiblemente el papel de estos transportadores en la rehidratación y retorno del estado VBNC se encuentra ligado al incremento de la adsorción de nutrientes, intercambios intra y extra celular y a la excreción de productos del metabolismo. En el proceso de retorno del estado VBNC de *Vibrio parahaemolyticus* los transportadores ABC se inducen en mayor proporción, la función de estos consistió en mantener la osmoregulación celular y la captación de nutrientes (Zhong *et al.*, 2019).

El segundo grupo con mayor número de genes inducidos durante desecación-rehidratación 24 h fueron aquellos relacionados con los procesos de óxido-reducción. Algunos de los genes incluidos en el grupo participan en diversas rutas metabólicas con actividad oxidorreductasa, tal es el caso del gen PP_4064 Isovaleril-CoA deshidrogenasa que forma parte del catabolismo de la leucina. Se ha señalado que algunas bacterias asimilan la leucina como fuente primaria de carbono e hidrógeno cuando no hay otros nutrientes disponibles en el medio (Díaz-Pérez *et al.*, 2016). El gen PP_3768 shikimato 5-deshidrogenasa es una oxidorreductasa que participa en la biosíntesis de los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano (Figura 20), la sobreexpresión del gen sugiere la síntesis *de novo* de estos aminoácidos posiblemente para actuar como solutos compatibles necesarios para sobrellevar el estrés hídrico. Además de los genes anteriormente mencionados, en el grupo se encuentran genes que codifican para proteínas con actividad antioxidante (PP_5054 glutarredoxina, PP_3587 proteína con dominio redoxina y PP_5069 tiorredoxina) y comparten participación con los procesos de homeostasis redox celular, la función de estas proteínas es principalmente la de disminuir la acumulación de ROS producidos durante el estrés osmótico e hídrico (Lebre *et al.*, 2017). Otro gen representado en los procesos de óxido-reducción fue PP_5066 que codifica para el antiportador potasio/protón (*cvrA*). El potasio es uno de los cationes monovalentes más abundantes en las bacterias, regula el pH, mantiene la homeóstasis celular y activa enzimas. Cuando *E. coli* se encuentra en un ambiente de baja osmolaridad acumula potasio (K⁺) a través de los sistemas antiportadores y este actúa



como soluto compatible (Empadinhas & Da Costa, 2008; Padan, Bibi, Ito, & Krulwich, 2005). Por otro lado cuando los niveles de K^+ son tóxicos para la célula, se activa la salida de K^+ para mantener el volumen celular en condiciones de alta alcalinidad (Radchenko *et al.*, 2006).

Otro grupo con menor cantidad de genes sobreexpresados fue la regulación de la transcripción. Interesantemente, la mayoría de los reguladores inducidos pertenecen a la familia TetR (PP_4754 PP_2951, PP_2880 y PP_2475). Se ha reportado que los reguladores de la familia TetR son abundantes en microorganismos expuestos a cambios ambientales y adaptaciones (Ramos *et al.*, 2005), además participan en el control de genes involucrados en la resistencia y biosíntesis de antibióticos, formación de biopelícula, respuesta a estrés, bombas de expulsión, metabolismo de aminoácidos, carbono, nitrógeno y lípidos (Chattoraj, Mohapatra, Uma Maheswar Rao, & Biswas, 2011; Cuthbertson & Nodwell, 2013); sugerimos que los reguladores de la familia TetR participan en los mecanismos de retorno del estado viable posiblemente regulando transportadores y bombas de eflujo, sin embargo no han sido reportados en ensayos de limitación de agua. Además de los reguladores de la familia TetR, se encontró que los reguladores LysR (PP_2250), AraC (PP_2072), MarA (PP_0175), GntR (PP_2253) y LuxR (PP_0574) se sobreexpresaron en nuestros ensayos, éstos participan regulando diversos procesos celulares entre ellos, la respuesta a estrés oxidativo, resistencia a antibióticos, virulencia, movilidad y quorum sensing (Ball *et al.*, 2017; Duval and Lister 2012; Gallegos *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2018).

El siguiente grupo de genes sobreexpresados fue procesos biosintéticos. Los genes PP_5078 3-dehidroquinato-synthase (*aroB*) y PP_3768 Shikimato 5-hidrogenasa (*aroE*) participan en la síntesis de tirosina y fenilalanina (Figura 20), mientras que los genes PP_3664 CDP- diacilglicerol O-fosfatidil transferasa (*pssA*) y PP_0671 serina hidroximetil transferasa (*glyA*) intervienen en la síntesis de glicina, serina y treonina (Figura 22). Es probable que la síntesis de aminoácidos *de novo* fuese una estrategia para acumular solutos compatibles y disminuir el estrés osmótico producto de la rehidratación (Kurz *et al.*, 2010). En cambio, los procesos catabólicos que engloban a los genes PP_3275 1,2-



fenilacetil-CoA oxigenasa subunidad (*phaH*), PP_3276 1,2-fenilacetil-CoA oxigenasa subunidad (*phaI*) y PP_3270 bifuncional alheído deshidrogenasa/enoil-CoA hidratasa (*phaL*), participan en la degradación de la fenilalanina (Figura 21), por lo que se sugiere que las células desecadas-rehidratadas obtienen nitrógeno del catabolismo de aminoácidos (Herrera, Daddaoua, Ana, & Ramos, 2012). Por otro lado, la expresión del gen PP_3303 3-oxoacil-ACP sintasa involucrado en la síntesis de ácidos grasos de tipo II, ruta principal en la producción de fosfolípidos de membrana en bacterias, coincide con la reparación al daño de la membrana ocasionado por la desecación en células de *P. putida* KT2440 (Pazos-Rojas *et al.*, 2019). El incremento en la proporción y las modificaciones de los ácidos grasos de la membrana preserva la fase cristalina, la permeabilidad y estabilidad de las proteínas de membrana en condiciones de desecación, temperatura, hambruna, pH, exposición a metales pesados y compuestos tóxicos (Halverson and Firestone 2000; Lebre *et al.*, 2017; Van De Mortel and Halverson 2004). El genoma de *P. putida* KT2440 contiene los genes que participan en la biosíntesis de celulosa y están distribuidos en el operon bcs (bacterial cellulose synthesis). El gen PP_2638 celulosa sintasa subunidad C forma parte del operon bcs, la celulosa al igual que el alginato contribuye a la protección de la membrana celular en condiciones de estrés osmótico manteniendo la integridad de la membrana y la actividad enzimática (Chang *et al.*, 2007; Gülez *et al.*, 2014; Svenningsen *et al.*, 2018)

El perfil de expresión de las células de *P. putida* KT2440 desecadas-rehidratadas por 24 horas reveló 43 genes reprimidos; en el análisis funcional de la categoría de proceso biológico se obtuvo que los procesos de traducción, oxido-reducción y regulación de la transcripción fueron los procesos con mayor abundancia de genes. En específico el proceso de traducción obtuvo el mayor número de genes reprimidos, este resultado indica que, durante la rehidratación prolongada con agua destilada estéril y deficiencia de nutrientes, las bacterias permanecen en un estado metabólico pausado ya que las células regulan negativamente los procesos de traducción como mecanismo de supervivencia para el ahorro de energía. Esta respuesta se ha documentado en algunas bacterias que ante la limitación de nutrientes, estrés oxidativo y arresto del crecimiento reprimen los genes involucrados en la transcripción y traducción, tal es el caso de *E. coli*



(Chang *et al.*, 2002; Gruzdev *et al.*, 2012). Asimismo, las sintetasas codificadas por los genes PP_4000 Seril-tARN sintetasa (*serS*) y PP_0201 Prolil-tARN sintetasa fueron reprimidas, por lo que se sugiere que las células emplean la traducción selectiva de ciertas proteínas para mantener la viabilidad celular. *E. coli* O157: H7 (Zhao *et al.*, 2016) y *Vibrio cholerae* (Xu *et al.*, 2018) mantienen la traducción en niveles bajos y específica como estrategia de supervivencia en condiciones de alta presión de CO₂ y estrés osmótico durante el estado VBNC. Se conoce que los niveles de las moléculas de aminoacil-tRNA tiene el papel de funcionar como señalizador para la activación de sensores de inanición, así como estimulación y limitación de la traducción ante el estrés por aminoácidos (Bullwinkle and Ibba, 2016). En el grupo de procesos de óxido-reducción regulado negativamente se encuentra el gen PP_3433 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (Figura 21), cuya represión afecta el catabolismo de fenilalanina desviando el carbono posiblemente hacia la biosíntesis de ubiquinona (PP_5318 4-hidroxibenzoato nonaprenil transferasa UbiA) en el nodo fenilpiruvato, esto se infiere porque que este gen se encuentra sobreexpresado. Como ya se mencionó anteriormente, la limitación de nutrientes induce la respuesta estricta y detiene el crecimiento celular. La respuesta estricta es desencadenada por la acumulación de la alarmona guanosín tetrafosfato (ppGpp) y guanosín pentafofosfato (pppGpp), que a la vez se sintetiza por las acción de los homólogos RelA y SpoT, aunque la expresión de RelA y SpoT no se vio afectada por la rehidratación de 24 horas, la represión de proteínas ribosomales (PP_4709, PP_2467, PP_0459, PP_0454 y PP_0446) y del regulador transcripcional RpoD (PP_0387), genes diana de (p)ppGpp sugiere que la respuesta estricta se encuentra activa en las bacterias desecadas-rehidratadas 24 h (Zhang *et al.*, 2019).

En la figura 25 se sintetiza la ubicación y participación de los genes diferencialmente expresados (sobreexpresados y reprimidos) durante el proceso de desecación-rehidratación por 24 horas y potencialmente involucrados en el retorno del estado VBNC de *P. putida* KT2440.

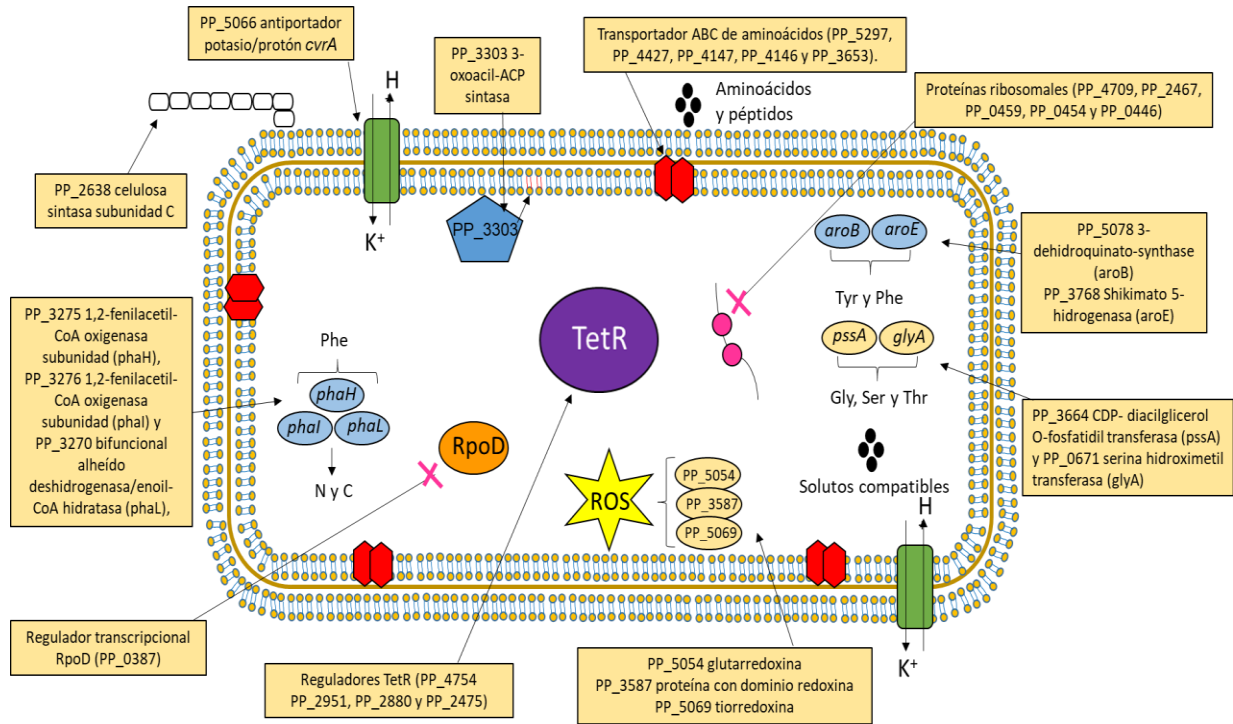


Figura 25. Ubicación y función de los genes diferencialmente expresados en los ensayos de desecación-rehidratación de 24 horas.



X. CONCLUSIONES

- Los sistemas de transporte se activaron durante el estado VBNC (deseccación-rehidratación de 20 minutos), estos fueron el receptor dependiente de TonB (PP_1446) que participa en la captación de sideróforos y los sistemas de transporte de alcoholes de cadena media (PP_2662 y PP_2676).
- La cepa mutante Δ PP_1446 presentó mayor tolerancia a la desecación que la cepa parental. La limitada capacidad de la mutante Δ PP_1446 para captar hierro del medio posiblemente favoreció su supervivencia durante la desecación debido a un menor daño causado por las reacciones de Fenton y producción de ROS
- Los procesos involucrados en el transporte, óxido-reducción y regulación de la transcripción se regularon positivamente durante la rehidratación de 24 horas.
- Las células rehidratadas activan el catabolismo de fenilalanina y leucina para obtener energía, al mismo tiempo activan la biosíntesis y captación de aminoácidos (Tyr, Phe, Trp, Gly, Ser Thr) para la síntesis y acumulación de solutos compatibles.
- Los procesos de traducción, óxido-reducción y regulación de la transcripción fueron regulados negativamente. La síntesis de proteínas se reduce y se vuelve selectiva durante la rehidratación prolongada y retorno del estado VBNC.
- Será interesante en trabajos futuros determinar la importancia para el estado VBNC de los genes sobreexpresados durante la rehidratación de 24 horas, principalmente aquellos que participan en la biosíntesis y catabolismo de aminoácidos.
- El conocer la probable función de los genes que no fueron clasificados en las listas de términos GO ayudara a comprender el retorno del estado VBNC de *P. putida* KT2440.



XI. CONGRESOS, CURSOS Y PUBLICACIÓN

▪ Congresos

Póster: Adaptación de *Pseudomonas putida* KT2440 a estrés por desecación. Lilia I. López-Lara, Marisol Vázquez-Quiroz, Lesther E. López-Cruz, Jesús Muñoz-Rojas, Verónica Quintero-Hernández, Antonino Báez-Rogelio. 2do. Congreso Nacional de investigaciones microbiológicas. Puebla, Pue 2016.

Presentación oral: Transcriptómica comparativa de una bacteria adaptada resistente a la desecación. Lilia I. López-Lara, Marisol Vázquez-Quiroz, Jesús Muñoz-Rojas, Verónica Quintero-Hernández, Antonino Báez-Rogelio. Foro de investigación multidisciplinaria sobre la biodiversidad: del laboratorio al campo y la industria. Puebla, Pue 2016.

▪ Cursos

Curso “Introducción al manejo y análisis de datos de secuenciación masiva de ADN”. Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática, Instituto de Biotecnología UNAM, del 2 al 5 de Agosto 2016. Cuernavaca, Morelos.

Curso “Manejo y análisis de datos de secuenciación masiva”. Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática, Instituto de Biotecnología UNAM, del 11 al 13 de Enero 2017. Cuernavaca, Morelos.


Curso “Introducción a R”. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México; e impartido por integrantes de la Unidad de Bioinformática, Bioestadística y Biología Computacional de la Red de Apoyo a la Investigación del 18 al 22 junio 2018.

▪ Publicación

López-Lara, L.I., Pazos-Rojas, L.A., López-Cruz, L.E., Morales-García, Y.E., Quintero-Hernández, V., De la Torre, J., Van Dillewijn, P., Muñoz-Rojas, J., and Baez, A. Influence of rehydration on transcriptome during resuscitation of desiccated *Pseudomonas putida* KT2440. *Ann Microbiol* 70, 54 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01596-3>.



Influence of rehydration on transcriptome during resuscitation of desiccated *Pseudomonas putida* KT2440

Lilia I. López-Lara¹, Laura A. Pazos-Rojas¹, Lesther E. López-Cruz¹, Yolanda E. Morales-García^{1,2}, Verónica Quintero-Hernández^{1,3}, Jesús de la Torre⁴, Pieter van Dillewijn⁴, Jesús Muñoz-Rojas^{1,5*} and Antonino Baez^{1,5*} 

Abstract

Purpose: *Pseudomonas putida* KT2440 is a desiccation-sensitive bacterium that loses culturability after 15 days of air desiccation. We have previously shown that *P. putida* KT2440 can develop a viable but nonculturable (VBNC) state after being exposed to desiccation stress and eventually recover when desiccated cells are rehydrated for at least 24 h.

Methods: To determine which genes of transport, oxidation-reduction, and transcription processes could be involved in the return of *P. putida* KT2440 to the culturable state, a transcriptome analysis was carried out comparing the gene expression of non-desiccated samples with samples subjected to desiccation followed by 20 min of rehydration or desiccation followed by 24 h of rehydration.

Results: Desiccation stress triggered a VBNC state of *P. putida*. The major response was detected after 24 h of rehydration with 148 upregulated and 42 downregulated genes. During the VBNC state, *P. putida* activated transmembrane transport processes like that of siderophores through a TonB-dependent transporter and putative polyhydric alcohol transport systems. Prolonged rehydration with distilled water resuscitated *P. putida* KT2440 cells activating the catabolism of phenylalanine/tyrosine to provide energy and carbon for ubiquinone biosynthesis while maintaining a reduced protein synthesis. On the other hand, the interruption of the TonB-dependent receptor gene (PP_1446) increased desiccation survival of the mutant strain.

Conclusion: The activation of the iron transport system (TonB-dependent siderophore receptor) and alcohol transport can be helping the VBNC state of *P. putida*. Activation of catabolism of phenylalanine/tyrosine and reduced protein synthesis was needed for resuscitation from the VBNC state.

Keywords: TonB-dependent receptor, Resuscitation, Survival, VBNC

Background

Beneficial interactions between plants and bacteria greatly favor plant growth and its protection against diseases and pests (Kloepper et al. 1989; Hayat et al. 2010). A successful interaction not only relies on the capabilities of the beneficial bacteria but also on abiotic factors such as temperature, pH, salinity, and water availability that can

disrupt the bacterial-plant interaction (Molina-Romero et al. 2017; Enebe and Babalola 2018). Water limiting conditions affect the viability of the cells and cause loss of membrane integrity, protein denaturation, accumulation of reactive oxygen species (ROS), and DNA damage leading to bacterial death (Potts 1994; Potts et al. 2005; Lebre et al. 2017). *Pseudomonas putida* KT2440 is a metabolically versatile Gram-negative, gamma-proteobacterium. *P. putida* KT2440 is a plant growth-promoting rhizobacterium (PGPR) able to colonize the rhizosphere of several plants, degrade organic pollutants, and fight plant diseases

* Correspondence: joymerre@hotmail.com; antonino.baez@correo.buap.mx
¹Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México
 Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.



XII. REFERENCIAS

- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Alpert, P. (2005). The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. *Integrative and Comparative Biology*, 45(5), 685–695. <https://doi.org/10.1093/icb/45.5.685>
- Asakura, H., Ishiwa, A., Arakawa, E., Makino, S. I., Okada, Y., Yamamoto, S., & Igimi, S. (2007). Gene expression profile of *Vibrio cholerae* in the cold stress-induced viable but non-culturable state. *Environmental Microbiology*, 9(4), 869–879. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01206.x>
- Ayrapetyan, M., Williams, T., & Oliver, J. D. (2018). Relationship between the Viable but Nonculturable State and Antibiotic Persister Cells. *Journal of Bacteriology*, 200(20), 1–15.
- Babu, D., Kushwaha, K., & Juneja, V. K. (2014). Viable but Nonculturable. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (Second Ed., Vol. 3). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00424-9>
- Ball, A. S., Chaparian, R. R., & Van Kessel, J. C. (2017). Quorum Sensing Gene Regulation by LuxR/HapR Master Regulators in *Vibrios*. *Journal of Bacteriology*, 199(19), 1–13.
- Bashan, Y., & Holguin, G. (1998). Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: Biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(8–9), 1225–1228. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00187-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00187-9)
- Billi, D., & Potts, M. (2002). Life and death of dried prokaryotes. *Research in Microbiology*, 153(1), 7–12. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01279-7](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01279-7)
- Bojanovic, K., D'Arrigo, I., & Long, K. S. (2017). Global Transcriptional Responses to Osmotic, Oxidative, and Imipenem Stress Conditions in *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(7), 1–18.
- Bullwinkle, T. J., & Ibbá, M. (2016). Translation quality control is critical for bacterial responses to amino acid stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(8), 2252–2257.



<https://doi.org/10.1073/pnas.1525206113>

- Chang, D. E., Smalley, D. J., & Conway, T. (2002). Gene expression profiling of *Escherichia coli* growth transitions: An expanded stringent response model. *Molecular Microbiology*, 45(2), 289–306. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03001.x>
- Chang, W. S., Van De Mortel, M., Nielsen, L., De Guzman, G. N., 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. <https://doi.org/10.1128/JB.00727-07>
- Chattoraj, P., Mohapatra, S. S., Uma Maheswar Rao, J. L., & Biswas, I. (2011). Regulation of transcription by SMU.1349, a tetR family regulator, in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*, 193(23), 6605–6613. <https://doi.org/10.1128/JB.06122-11>
- Cuthbertson, L., & Nodwell, J. R. (2013). The TetR Family of Regulators. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(3), 440–475. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00018-13>
- Cytryn, E. J., Sangurdekar, D. P., Streeter, J. G., Franck, W. L., Chang, W. S., Stacey, G., ... Sadowsky, M. J. (2007). Transcriptional and physiological responses of *Bradyrhizobium japonicum* to desiccation-induced stress. *Journal of Bacteriology*, 189(19), 6751–6762. <https://doi.org/10.1128/JB.00533-07>
- de Souza, R., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38(4), 401–419. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>
- Díaz-Pérez, A. L., Díaz-Pérez, C., & Campos-García, J. (2016). Bacterial l-leucine catabolism as a source of secondary metabolites. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 15(1), 1–29. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9385-3>
- Ding, T., Suo, Y., Xiang, Q., Zhao, X., Chen, S., Ye, X., & Liu, D. (2017). Significance of viable but nonculturable *Escherichia coli*: Induction, detection, and control. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(3), 417–428. <https://doi.org/10.4014/jmb.1609.09063>



- Dong, K., Pan, H., Yang, D., Rao, L., Zhao, L., Wang, Y., & Liao, X. (2020). Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(1), 149–183. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12513>
- Duval, V., & Lister, I. M. (2012). MarA, SoxS and Rob of Escherichia coli – Global regulators of multidrug resistance, virulence and stress response. *Int J Biotechnol Wellness Ind*, 2(3)(1), 1–7. <https://doi.org/doi:10.6000/1927-3037.2013.02.03.2>
- Empadinhas, N., & Da Costa, M. S. (2008). Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: Distribution of compatible solutes. *International Microbiology*, 11(3), 151–161. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.55>
- Esbelin, 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>
- Espinosa-Urgel, M., Kolter, R., & Ramos, J.-L. (2002). Root colonization by *Pseudomonas putida*: love. *Microbiology*, 148(2), 341–344. Retrieved from <http://mic.sgmjournals.org/content/148/2/341.short>
- Feder, M. E., & Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, 61(May), 243–282. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.61.1.243>
- Fernández, M., Conde, S., De La Torre, J., Molina-Santiago, C., Ramos, J. L., & Duque, E. (2012). Mechanisms of resistance to chloramphenicol in *Pseudomonas putida* KT2440. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(2), 1001–1009. <https://doi.org/10.1128/AAC.05398-11>
- Fernández, M., Niqui-Arroyo, J. L., Conde, S., Ramos, J. L., & Duque, E. (2012). Enhanced tolerance to naphthalene and enhanced rhizoremediation performance for *Pseudomonas putida* KT2440 via the NAH7 catabolic plasmid. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), 5104–5110. <https://doi.org/10.1128/AEM.00619-12>
- Figueiredo M.d.V.B., Bonifacio A., C.-R. A. and A. F. (2016). Chapter 3: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Key Mechanisms of Action. https://doi.org/10.1007/978-981-10-0388-2_3



- Follonier, S., Escapa, I. F., Fonseca, P. M., Henes, B., Panke, S., Zinn, M., & Prieto, M. A. (2013). New insights on the reorganization of gene transcription in *Pseudomonas putida* KT2440 at elevated pressure. *Microbial Cell Factories*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-30>
- Franklin, F. C. H., Bagdasarian, M., Bagdasarian, M. M., & Timmis, K. N. (1981). Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(12 II), 7458–7462. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7458>
- Fujita, M., Mori, K., Hara, H., Hishiyama, S., Kamimura, N., & Masai, E. (2019). A TonB-dependent receptor constitutes the outer membrane transport system for a lignin-derived aromatic compound. *Communications Biology*, 2(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0676-z>
- Gallegos, M. T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K., & Ramos, J. L. (1997). Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 61(4), 393–410. <https://doi.org/10.1128/61.4.393-410.1997>
- García-Fraile, P., Menéndez, E., & Rivas, R. (2015). Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *AIMS Bioengineering*, 2(3), 183–205. <https://doi.org/10.3934/bioeng.2015.3.183>
- Gennaris, A., Ezraty, B., Henry, C., Agrebi, R., Vergnes, A., Oheix, E., ... Barras, F. (2015). Repairing oxidized proteins in the bacterial envelope using respiratory chain electrons. *Nature*, 528(7582), 409–412. <https://doi.org/10.1038/nature15764>
- Glick, B. R. (2012). *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. 2012*. <https://doi.org/https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Gouffi, K., Pichereau, V., Rolland, J. P., Thomas, D., Bernard, T., & Blanco, C. (1998). Sucrose is a nonaccumulated osmoprotectant in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 180(19), 5044–5051. <https://doi.org/10.1128/jb.180.19.5044-5051.1998>
- Gruzdev, N., McClelland, M., Porwollik, S., Ofaim, S., Pinto, R., & Saldinger-Sela, S. (2012). Global transcriptional analysis of dehydrated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(22), 7866–7875.



<https://doi.org/10.1128/AEM.01822-12>

- Gülez, G., Altıntaş, A., Fazli, M., Dechesne, A., Workman, C. T., Tolker-Nielsen, T., & Smets, B. F. (2014). Colony morphology and transcriptome profiling of *Pseudomonas putida* KT2440 and its mutants deficient in alginate or all EPS synthesis under controlled matrix potentials. *MicrobiologyOpen*, 3(4), 457–469. <https://doi.org/10.1002/mbo3.180>
- Gülez, 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.06150-11>
- Halverson, L. J., & Firestone, M. K. (2000). *Differential Effects of Permeating and Nonpermeating Solutes on the Fatty Acid Composition of Pseudomonas putida -- Halverson and Firestone 66 (6) 2414 -- Applied and Environmental Microbiology. 66(6), 2414–2421.*
- Hauryliuk, V., Atkinson, G. C., Murakami, K. S., Tenson, T., & Gerdes, K. (2015). Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), 298–309. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3448>
- Heim, S., Heim, S., Del, M., Del, M., Lleo, M., Lleo, M., ... Canepari, P. (2002). The Viable but Nonculturable State and Starvation Are Different Stress Responses of. *Society*, 184(23), 6739–6745. <https://doi.org/10.1128/JB.184.23.6739>
- Hernández-Canseco, J. (2015). *Supervivencia a la desecación de bacterias que cointeraccionan antes del estrés.*
- Herrera, M. C., Daddaoua, A., Ana, F. E., & Ramos, J. L. (2012). Involvement of the global crp regulator in cyclic amp-dependent utilization of aromatic amino acids by *pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, 194(2), 406–412. <https://doi.org/10.1128/JB.06353-11>
- lobbi-Nivol, C., & Leimkühler, S. (2013). Molybdenum enzymes, their maturation and molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1827(8–9), 1086–1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.11.007>
- Kamilova, F., Kravchenko, L. V., Shaposhnikov, A. I., Azarova, T., Makarova, N., & Lugtenberg, B. (2006). Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of



- vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(3), 250–256. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0250>
- Kloepper, J. W., Lifshitz, R., & Zablottovicz, R. M. (1989). *Free-living bacteria inocula for enhancing crop productivity*. *Trends Biotechnol* 7 : 39-44. 7799(February 1989), 39–44. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(89\)90057-7](https://doi.org/10.1016/0167-7799(89)90057-7)
- Kurz, M., Buren, A. Y., Seip, B., Lindow, S. E., & Gross, H. (2010). Genome-driven investigation of compatible solute biosynthesis pathways of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and their contribution to water stress tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(16), 5452–5462. <https://doi.org/10.1128/AEM.00686-10>
- Labrude, P., Chaillot, B., & Vigneron, C. (1987). Problems of haemoglobin freeze-drying: evidence that water removal is the key to iron oxidation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 39(5), 344–348. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1987.tb03396.x>
- Lebre, P. H., De Maayer, P., & Cowan, D. A. (2017). Xerotolerant bacteria: Surviving through a dry spell. *Nature Reviews Microbiology*, 15(5), 285–296. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.16>
- Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D., & Faucher, S. P. (2014). The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 5(JUN), 1–1. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00258>
- Li, W. J., Jayakody, L. N., Franden, M. A., Wehrmann, M., Daun, T., Hauer, B., ... Wierckx, N. (2019). Laboratory evolution reveals the metabolic and regulatory basis of ethylene glycol metabolism by *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, 21(10), 3669–3682. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14703>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lynch, J. M. (2002). *Rhizosphere*. 1–8.
- Mattimore, V., & Battista, J. R. (1996). Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: Functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *Journal of Bacteriology*, 178(3), 633–637.



<https://doi.org/10.1128/jb.178.3.633-637.1996>

- Meng, L., Alter, T., Aho, T., & Huehn, S. (2015). Gene expression profiles of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but non-culturable state. *FEMS Microbiology Ecology*, *91*(5), 1–12. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv035>
- Menikpurage, I. P., Barraza, D., Meléndez, A. B., Strebe, S., & Mera, P. E. (2019). The B12 receptor BtuB alters the membrane integrity of *Caulobacter crescentus*. *Microbiology (United Kingdom)*, *165*(3), 311–323. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000753>
- Minic, Z. (2015). Proteomic Studies of the Effects of Different Stress Conditions on Central Carbon Metabolism in Microorganisms. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, *08*(05), 80–90. <https://doi.org/10.4172/jpb.1000355>
- Molina-Henares, M. A., de la Torre, J., García-Salamanca, A., Molina-Henares, A. J., Herrera, M. C., Ramos, J. L., & Duque, E. (2010). Identification of conditionally essential genes for growth of *Pseudomonas putida* KT2440 on minimal medium through the screening of a genome-wide mutant library. *Environmental Microbiology*, *12*(6), 1468–1485. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02166.x>
- Molina-Romero, D., Baez, A., Quintero-Hernández, V., Castañeda-Lucio, M., Fuentes-Ramírez, L. E., Bustillos-Cristales, M. del R., ... Muñoz-Rojas, J. (2017). Compatible bacterial mixture, tolerant to desiccation, improves maize plant growth. *PLoS ONE*, *12*(11), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187913>
- Molina, L. Á., Ramos, C., Duque, E., Ronchel, M. C., García, J. M., Wyke, L., & Ramos, J. L. (2000). Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, *32*(3), 315–321. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00156-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00156-X)
- Molina, M. A., Godoy, P., Ramos-González, M. I., Muñoz, N., Ramos, J. L., & Espinosa-Urgel, M. (2005). Role of iron and the TonB system in colonization of corn seeds and roots by *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, *7*(3), 443–449. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00720.x>
- Muñoz-Arenas, L. C. (2011). *Estrategias de Pseudomonas putida* KT2440 para enfrentar el proceso de desecación.
- Muñoz-Rojas J, Bernal P, Duque E, Godoy P, Segura A, R. J. (2006). Involvement of



- cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. *Appl Environ Microbiol*, 72(1), 472–477. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1128/AEM.72.1.472-477.2006>
- Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A. P., ... Fraser, C. M. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, 4(12), 799–808. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00366.x>
- Nikel, P. I., Kim, J., & de Lorenzo, V. (2014). Metabolic and regulatory rearrangements underlying glycerol metabolism in *Pseudomonas putida*KT2440. *Environmental Microbiology*, 16(1), 239–254. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12224>
- Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T. J., & Buchanan, S. K. (2010). TonB-dependent transporters: Regulation, structure, and function. *Annual Review of Microbiology*, 64(75), 43–60. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134247>
- Ophir, T., & Gutnick, D. L. (1994). A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(2), 740–745. <https://doi.org/10.1128/aem.60.2.740-745.1994>
- Padan, E., Bibi, E., Ito, M., & Krulwich, T. A. (2005). Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1717(2), 67–88. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.09.010>
- Pasquale, D. M. (2019). *Understanding the role of iron in biofilm formation, characterization and viable but non-culturable state induction and resuscitation in Salmonella Spp.* The uniservity of British Columbia.
- Paul, D., & Nair, S. (2008). Stress adaptations in a Plant Growth Promoting Rhizobacterium (PGPR) with increasing salinity in the coastal agricultural soils. *Journal of Basic Microbiology*, 48(5), 378–384. <https://doi.org/10.1002/jobm.200700365>
- Payne, S. M., Mey, A. R., & Wyckoff, E. E. (2016). Vibrio Iron Transport: Evolutionary Adaptation to Life in Multiple Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 69–90. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00046-15>
- Pazos-rojas, L. A. (2011). *Estudios biológicos sobre la supervivencia de Pseudomonas putida KT2440 a la desecación.*



- Pazos-rojas, L. A. (2019). *Evaluación de los cambios moleculares que ocurren durante la desecación-rehidratación de Pseudomonas putida KT2440*.
- Pazos-Rojas, L. A., Muñoz-Arenas, L. C., Rodríguez-Andrade, O., López-Cruz, L. E., López-Ortega, O., Lopes-Olivares, F., ... Muñoz-Rojas, J. (2019). Desiccation-induced viable but nonculturable state in *Pseudomonas putida* KT2440, a survival strategy. In *PLoS ONE* (Vol. 14). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219554>
- Pazos-rojas, L. A., Rodríguez-andrade, O., Muñoz-arenas, L. C., Morales-, Y. E., Corral-lugo, A., Quintero-hernández, V., ... Muñoz-, J. (2018). Desiccation-Tolerant Rhizobacteria Maintain their Plant Growth- Promoting Capability after Experiencing Extreme Water Stress. *SciFed Journal of Applied Microbiology*, 1(1).
- Pienaar, J. A., Singh, A., & Barnard, T. G. (2016). The viable but non-culturable state in pathogenic *Escherichia coli*: A general review. *African Journal of Laboratory Medicine*, 5(1), 1–9. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4102/ajlm.v5i1.368>
- Pinto, D., Almeida, V., Almeida Santos, M., & Chambel, L. M. M. (2011). Resuscitation of *Escherichia coli* VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli. *Journal of Applied Microbiology*, 110(6), 1601–1611. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05016.x>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02231-4](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02231-4)
- Pseudomonas* reference culture collection. (n.d.). Retrieved from <http://artemisa.eez.csic.es/prcc/>
- Puig, S., Ramos-Alonso, L., Romero, A. M., & Martínez-Pastor, M. T. (2017). The elemental role of iron in DNA synthesis and repair. *Metallomics*, 9(11), 1483–1500. <https://doi.org/10.1039/c7mt00116a>
- Purvis, J. E., Yomano, L. P., & Ingram, L. O. (2005). Enhanced trehalose production improves growth of *Escherichia coli* under osmotic stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3761–3769. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3761-3769.2005>
- Radchenko, M. V., Tanaka, K., Waditee, R., Oshimi, S., Matsuzaki, Y., Fukuhara, M., ... Nakamura, T. (2006). Potassium/proton antiport system of *Escherichia coli*. *Journal*



- of *Biological Chemistry*, 281(29), 19822–19829.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M600333200>
- Ramos, J. L., Martí, M., Molina-henares, A. J., Tera, W., Brennan, R., & Tobes, R. (2005). Microbiol Mol Biol Rev 2005 RamosThe TetR family of transcriptional. *Society*, 69(2), 1–31. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.2.326>
- Raza, F. A., & Faisal, M. (2013). Growth promotion of maize by desiccation tolerant micrococcus luteus-cp37-chp37 isolated from Cholistan desert, Pakistan. *Australian Journal of Crop Science*, 7(11), 1693–1698.
- Reissbrodt, R., Reissbrodt, R., Rienaeker, I., Rienaeker, I., Romanova, J. M., Romanova, J. M., ... Williams, P. H. (2002). Resuscitation of Salmonella enterica Serovar Typhimurium and Enterohemorrhagic Escherichia coli from the Viable but Nonculturable State by Heat-Stable Enterobacterial Autoinducer. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 4788–4794.
<https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.4788>
- Roberson, E. B., & Firestone, M. K. (1992). Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil Pseudomonas sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(4), 1284–1291. <https://doi.org/10.1128/aem.58.4.1284-1291.1992>
- Rowe, M. T., & Madden, R. H. (2014). Campylobacter: Introduction. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, 1, 351–356. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00052-5>
- Scherber, C. M., Schottel, J. L., & Aksan, A. (2009). Membrane phase behavior of Escherichia coli during desiccation, rehydration, and growth recovery. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1788(11), 2427–2435.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.08.011>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Svenningsen, N. B., Martínez-García, E., Nicolaisen, M. H., de Lorenzo, V., & Nybroe, O. (2018). The biofilm matrix polysaccharides cellulose and alginate both protect Pseudomonas putida mt-2 against reactive oxygen species generated under matrix stress and copper exposure. *Microbiology (United Kingdom)*, 164(6), 883–888.



<https://doi.org/10.1099/mic.0.000667>

- Tilak, K. V. B. R., Ranganayaki, N., Pal, K. K., De, R., Saxena, A. K., Nautiyal, C. S., ... Johri, B. N. (2005). Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science*, 89(1), 136–150.
- Tkacz, A., Bestion, E., Bo, Z., Hortala, M., & Poole, P. S. (2020). Influence of plant fraction, soil, and plant species on microbiota: A multikingdom comparison. *MBio*, 11(1), 1–17. <https://doi.org/10.1128/mBio.02785-19>
- Touati, D. (2000). Iron and Oxidative Stress in Bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 373(1), 1–6.
- Uhlířová, E., Elhottová, D., Tříska, J., & Šantrůčková, H. (2005). Physiology and microbial community structure in soil at extreme water content. *Folia Microbiologica*, 50(2), 161–166. <https://doi.org/10.1007/BF02931466>
- Vallon, T., Simon, O., Rendgen-Heugle, B., Frana, S., Mückschel, B., Broicher, A., ... Takors, R. (2015). Applying systems biology tools to study n-butanol degradation in *Pseudomonas putida* KT2440. *Engineering in Life Sciences*, 15(8), 760–771. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400051>
- Van De Mortel, M., & Halverson, L. J. (2004). Cell envelope components contributing to biofilm growth and survival of *Pseudomonas putida* in low-water-content habitats. *Molecular Microbiology*, 52(3), 735–750. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04008.x>
- Vitor A.P. Martins dos Santos, Kenneth N. Timmis, B. T. and C. W. (2004). Chapter 3: Genomic features of *Pseudomonas putida* strain KT2440. In J.-L. Ramos (Ed.), *Pseudomonas* (Vol 1, pp. 77–112). New York: Plenum publishers.
- Wang, C. H., Wu, L., Wang, Z., Alabady, M. S., Parson, D., Molumo, Z., & Fankhauser, S. C. (2020). Characterizing changes in soil microbiome abundance and diversity due to different cover crop techniques. *PLoS ONE*, 15(5), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232453>
- Xia, Z., Lei, L., Zhang, H. Y., & Wei, H. L. (2018). Characterization of the ModABC molybdate transport system of *pseudomonas putida* in nicotine degradation. *Frontiers in Microbiology*, 9(DEC), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03030>
- Xu, T., Cao, H., Zhu, W., Wang, M., Du, Y., Yin, Z., ... Liu, B. (2018). RNA-seq-based

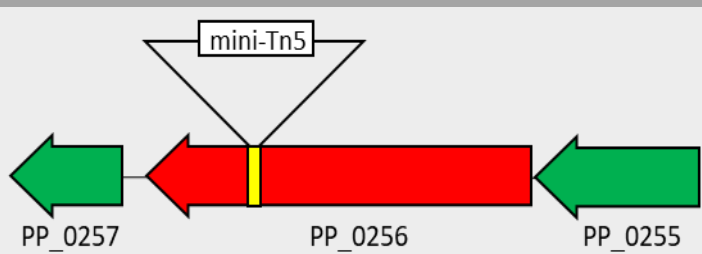
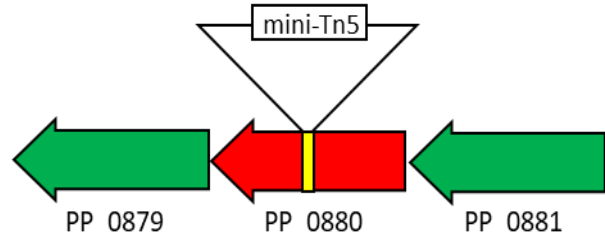
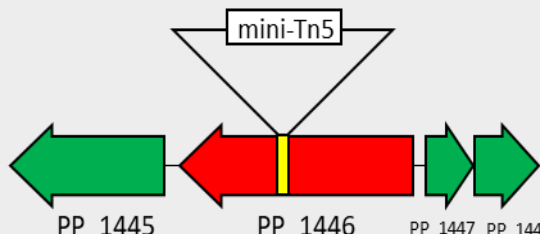
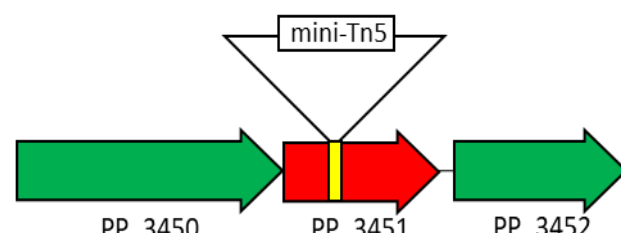


- monitoring of gene expression changes of viable but non-culturable state of *Vibrio cholerae* induced by cold seawater. *Environmental Microbiology Reports*, 10(5), 594–604. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12685>
- Zapras, A., Bleisteiner, M., Kerres, A., Hoffmann, T., & Bremer, E. (2015). Uptake of amino acids and their metabolic conversion into the compatible solute proline confers osmoprotection to *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(1), 250–259. <https://doi.org/10.1128/AEM.02797-14>
- Zhang, Q., & Yan, T. (2012). Correlation of intracellular trehalose concentration with desiccation resistance of soil *Escherichia coli* populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(20), 7407–7413. <https://doi.org/10.1128/AEM.01904-12>
- Zhang, Yanan, Teper, D., Xu, J., & Wang, N. (2019). Stringent response regulators (p)ppGpp and DksA positively regulate virulence and host adaptation of *Xanthomonas citri*. *Molecular Plant Pathology*, 20(11), 1550–1565. <https://doi.org/10.1111/mpp.12865>
- Zhang, Yong, Li, J., Zhang, W., Shi, H., Luo, F., Hikichi, Y., ... Ohnishi, K. (2018). A putative LysR-type transcriptional regulator PrhO positively regulates the type III secretion system and contributes to the virulence of *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Plant Pathology*, 19(8), 1808–1819. <https://doi.org/10.1111/mpp.12660>
- Zhao, F., Wang, Y., An, H., Hao, Y., Hu, X., & Liao, X. (2016). New insights into the formation of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 induced by high-pressure CO₂. *MBio*, 7(4), 1–11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00961-16>
- Zhong, Q., Wang, B., Wang, J., Liu, Y., Fang, X., & Liao, Z. (2019). Global Proteomic Analysis of the Resuscitation State of *Vibrio parahaemolyticus* Compared with the Normal and Viable but Non-culturable State. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01045>

XIII. ANEXOS

Anexo 1: Contexto genómico de las mutantes de *P. putida* KT2440

Las mutantes fueron donadas por el Consejo superior de investigaciones científicas, Estación experimental del Zaidín (CSIC-EEZ). La colección de mutantes de *P. putida* KT2440 se obtuvo por mutagénesis empleando el transposón mini-Tn5 (Km), la posición del transposón se identificó por PCR arbitraria (<http://artemisa.eez.csic.es/prcc/>).

Mutante	Posición mini-Tn5	Mapa
Δ PP_0256	310452	
Δ PP_0880	1020462	
Δ PP_1446	1649678	
Δ PP_3451	3910897	



Anexo 2: Extracción de DNA

Extracción de DNA con el kit Bacteria DNA preparation kit-spin column-based (Jena Bioscience PP-214L)

1. Centrifugar 1mL de cultivo a 6000 rpm por 1 minuto. Al finalizar se descarta el sobrenadante.
2. Añadir al tubo con el pellet 300 μ L de Lysis Buffer y 2 μ l de RNase A y se mezcla en vórtex por 30-60 segundos.
3. Adicionar 8 μ L de Proteinase K y se mezcla por pipeteo. Se incuba la reacción a 60 °C por 10 minutos y al terminar se coloca en hielo por 5 minutos.
4. Agregar 300 μ L de Binding Buffer y mezclar en vórtex. La mezcla de reacción se coloca en hielo por 5 minutos. Terminado el tiempo se centrifuga a 14000 rpm por 5 minutos.
5. Preparación de la columna: Se coloca un spin column en un collection tube de 2 mL. Se añade 100 μ L de Activation Buffer en el spin column y se centrifuga por 1 min a 14000 rpm y se descarta el líquido restante de la collection tube.
6. Se coloca el spin column en un nuevo tubo collection tube y se pipetea el lisado del tubo de la mezcla de reacción. Se centrifuga a 14000 rpm por 1 min. Y se descarta el líquido restante de la collection tube.
7. Agregar 500 μ L de Washing Buffer en el spin column. Y centrifugar 30 segundos a 14000 rpm. Se descarta el líquido de la collection tube.
8. Añadir 500 μ L de Washing Buffer en el spin column y centrifugar 30 segundos a 14000 rpm. Se descarta el líquido de la collection tube.
9. Centrifugar nuevamente por 1 min a 14000 rpm y se remueve el líquido del collection tube y se deshecha.
10. La elución del DNA se realiza agregando 40-50 μ L de Elution Buffer en el centro del spin column. Se incuba por 1 min a TA.
11. Se centrifuga a 14000 rpm por 2 min. El DNA se almacena a 20° C.
12. El DNA se corre en un gel de agarosa 1% por 30 minutos a 100 volts, a cada muestra se le coloca 1 μ L de solución de GelRed®.



Anexo 3: Amplificación del gen 16S

La amplificación del gen 16S se llevó a cabo con los siguientes oligonucleótidos:

Oligonucleótidos 16S <i>P. putida</i>	
UN27F	TAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG
UN1392R	CAG GGG CGG TGT GTA CA

Para la mezcla de reacción se utilizaron los siguientes componentes:

Mezcla de reacción PCR 16S	
Master mix Go Taq® (Promega M7122)	10 µL
Oligonucleótido UN27F	1 µL
Oligonucleótido UN1392R	1 µL
DNA	5 µL
Agua	3 µL
Vol. Total	20 µL

Y las condiciones de amplificación fueron:

Amplificación 16S	
95 °C x 3 minutos	} 30 Ciclos
95 °C x 30 segundos	
52 °C x 45 segundos	
72 °C x 1.5 minutos	
72 °C x 5 minutos	
4 °C x ∞	

Las muestras de los amplificadas se corrieron en un gel de agarosa 1% por 30 minutos a 100 volts, a cada muestra se le colocó 1 µL de solución de GelRed®. Se obtuvieron amplificadas de 1379 pb.



Anexo 4: Digestión del gen 16S

Las mezclas de digestión con la enzima *HhaI* se llevaron a cabo de la siguiente manera:

Digestión <i>HhaI</i>	
Agua	6.9 μL
Buffer	2.5 μL
BSA 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0.1 μL
Enzima <i>HhaI</i> 10 U/ μl (Promega R6441)	0.5 μL
DNA	10 μL
Vol. Total	20 μL

La reacción se incubó por 1.5 horas a 37 °C.

Las digestiones se corrieron en un gel de agarosa 3% por 45 minutos a 100 volts, a cada muestra se le colocó 1 μL de solución de GelRed[®]. Se obtuvieron 5 fragmentos de 357, 305, 279, 250 y 199 pb, concordando con la predicción *in silico*.



Anexo 5: Tinción con el kit LIVE/DEAD

Kit LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability Kit for microscopy (Molecular Probes Invitrogen Detection Technologies).

1. Las células desecadas se rehidrataron 20 minutos, las muestras no desecadas no se centrifugan.
2. Se toman 10 μ l de cada condición y se colocan en un tubo nuevo.
3. Los fluoróforos se mezclan en partes iguales en un tubo (componente A y componente B).
4. A cada tubo se le añaden 1 μ l de la mezcla de tinción y se mezclan suavemente.
5. Cada reacción se incuba por 15 minutos a TA en oscuridad.
6. Se coloca toda la mezcla de reacción en un portaobjetos y se coloca un cubreobjetos.
7. Se agrega una gota de glicerol a cada portaobjetos y se colocan en el microscopio de fluorescencia VE-146YT.
8. Las muestras se observan a 1000X, filtro G (excitación 500-550nm) para ver bacterias teñidas de rojo y el filtro B (excitación 420-490nm) para las bacterias teñidas de verde.