



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA**

**DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS MOLECULARES  
QUE OCURREN DURANTE LA DESECACIÓN-  
REHIDRATACIÓN DE *Pseudomonas putida*  
KT2440**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**M. C. LAURA ABISAI PAZOS ROJAS**

**DIRECTORES**

**D.C. SILVIA LUNA SUÁREZ**

**D.C. JESÚS MUÑOZ ROJAS**

**JUNIO 2019**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

SIP-13-BIS

*ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS  
Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS*

México, D.F. a 13 de SEPTIEMBRE del 2016

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA TLAXCALA en su sesión EXTRAORDINARIA No. 8 celebrada el día 21 del mes de SEPTIEMBRE conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

PAZOS  
Apellido paterno

ROJAS  
Apellido materno

LAURA ABISAI  
Nombre (s)

Con registro: 

A	1	5	0	0	0	4
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:  
EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS MOLECULARES QUE OCURREN DURANTE LA DESECACIÓN-REHIDRATACIÓN DE *Pseudomonas putida* KT2440

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:  
DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DE *Pseudomonas putida* KT2440 EN DESECACIÓN  
EVALUACIÓN DE CAMBIOS A NIVEL MOLECULAR QUE PROVOCA LA DESECACIÓN  
IDENTIFICACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA TOLERANCIA A DESECACIÓN

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:  
D.C. SILVIA LUNA SUÁREZ D.C. JESÚS MUÑOZ ROJAS

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en:  
LABORATORIO DE ECOLOGÍA MOLECULAR MICROBIANA CICM-BUAP Y CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA  
que cuentan con los recursos e infraestructura necesarios.


4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

  
D.C SILVIA LUNA SUÁREZ

Aspirante

  
LAURA ABISAI PAZOS ROJAS

  
D.C JESÚS MUÑOZ ROJAS

Presidente del Colegio

  
D.C. MARÍA MYRNA SOLÍS OBA





**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14-BIS

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitl de Lardizabal siendo las 13:00 horas del día 27 del mes de Junio del 2019 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA para examinar la tesis titulada:  
Evaluación de los cambios moleculares que ocurren durante la desecación-rehidratación de *Pseudomonas putida* KT2440

Presentada por el alumno:

Pazos Rojas Laura Abisai  
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)

Con registro: 

A	1	5	0	0	0	4
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

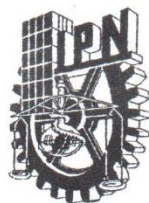
Directores de tesis

 _____ D.C. Silvia Luna Suarez	 _____ D.C. Jesus Munoz Rojas
 _____ D.C. Miguel Angel Villalobos Lopez	 _____ D.C. Ana Lilia Arroyo Becerra
 _____ D.C. Xianwu Guo	 _____ D.C. Flor del Palma Rojas Cardenas

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

\_\_\_\_\_  
D.C. Diana Verónica Cortes Espinosa

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
Centro de Investigación y Tecnología Aplicada  
Unidad Toluca  
DIRECCIÓN



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de Tepetitla de Lardizabal el día 27 del mes Junio del año 2019, el (la) que suscribe Laura Abisai Pazos Rojas alumno (a) del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología con número de registro A150004, adscrito a CIBA, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de D.C. Silvia Luna Suárez y cede los derechos del trabajo intitulado EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS MOLECULARES QUE OCURREN DURANTE LA DESECACIÓN-REHIDRATACIÓN DE *Pseudomonas putida* KT2440, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección [joymerre@yahoo.com](mailto:joymerre@yahoo.com) ó [silvial2004@yahoo.com.mx](mailto:silvial2004@yahoo.com.mx) Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Laura Abisai Pazos Rojas

# Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Quiero agradecer a Dios por la vida, salud y sabiduría que me ha dado para poder culminar esta etapa profesional en mi vida.

Gracias a los dos grandes amores de mi vida (Luis y Lysander) por darme todo su apoyo, energía y comprensión durante estos 4 años.

Gracias a mis padres por todo el apoyo recibido.

Gracias a mis compañeros de laboratorio que siempre me han brindado todo su apoyo y ayuda y por hacer mas ligero el trabajo. Gracias Osvaldo, Lesther, Lili, América, Maritza.

Gracias al dr Miguel Angel Villalobos, la dra Ana Lilia Arroyo y al dr Xianwu Guo por todas sus valiosas aportaciones para enriquecer esta investigación.

Gracias a la dra Silvia Luna Suárez porque siempre me brindó toda su confianza, apoyo y comprensión durante estos 4 años, ¡GRACIAS! por recibirme como una estudiante mas de su grupo y brindarme todas las facilidades que estuvieron a su alcance.

Gracias al dr. Jesús Muñoz Rojas por todo lo que me ha enseñado en estos tantos años juntos de trabajo, gracias porque siempre ha sabido guiarme, porque siempre ha dicho las palabras correctas en el momento indicado, gracias por toda la enseñanza profesional y personal que me ha brindado, ¡¡¡GRACIAS!!! por toda la confianza y porque siempre ha creído en mi capacidad.

# Dedicatoria

*Al amor de mi vida **Luis** por todo tu apoyo, amor, comprensión y paciencia en mi crecimiento profesional, eres el mejor hombre*

*Al otro amor de vida **Lysander**, mi pequeño hijo que con toda tu energía y alegría haz sido mi mayor motivación para seguir creciendo personal y profesionalmente*

# ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	3
I. INTRODUCCIÓN .....	5
II. ANTECEDENTES.....	6
❖ DAÑOS MOLECULARES PROVOCADOS POR LA DESECACIÓN .....	7
❖ <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 y el estrés por desecación.....	8
❖ ESTADO VIABLE NO CULTIVABLE (VBNC) EN BACTERIAS.....	9
III. JUSTIFICACIÓN.....	10
IV. HIPÓTESIS.....	10
V. OBJETIVOS .....	10
VI. MATERIALES Y MÉTODOS .....	11
1. VIABILIDAD DE <i>P. PUTIDA</i> KT2440 BAJO ESTRÉS POR DESECACIÓN.....	11
1.1 Crecimiento bacteriano y experimentos de desecación .....	11
1.2 Adherencia de <i>P. putida</i> KT2440 a semillas de maíz germinado después de la desecación. ....	12
1.3 Rehidratación de <i>P. putida</i> KT2440 con exudados rizosféricos de maíz. ....	13
1.4 Crecimiento de <i>P. putida</i> KT2440 en presencia de exudados rizosféricos de maíz bajo condiciones estáticas.....	14
1.5 Daño a membrana en <i>P. putida</i> KT2440 durante la desecación .....	14
1.6 Análisis TEM de <i>P. putida</i> KT2440 bajo estrés por desecación.....	15
1.7 Expresión de algunos genes constitutivos en <i>P. putida</i> KT2440 bajo estrés por desecación .....	16
2. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS DE MEMBRANA PLASMÁTICA EN <i>P. PUTIDA</i> KT2440 BAJO ESTRÉS POR DESECACIÓN .....	18
3. IDENTIFICACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS CON LA RESISTENCIA A DESECACIÓN DE <i>P. PUTIDA</i> KT2440 .....	18
3.1 Mutagénesis al azar en <i>P. putida</i> KT2440.....	18
3.1.1 Generación de una colección de mutantes de <i>P. putida</i> KT2440 por mutagénesis al azar usando un sofisticado robot picacolonia.....	19
3.1.2 Determinación y comprobación de la inserción del cassette de <i>Gm</i> en <i>P. putida</i> KT2440:: <i>miniTn5Gm</i> 20	
3.1.3 Evaluación de mutantes de <i>P. putida</i> KT2440:: <i>miniTn5Gm</i> en su tolerancia a desecación. ....	21
3.1.4 Determinación del sitio de inserción del <i>miniTn5</i> en cepas <i>P. putida</i> KT2440:: <i>miniTn5Gm</i> sensibles y resistentes a desecación .....	22
3.2 ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE <i>P. PUTIDA</i> KT2440 BAJO ESTRÉS POR DESECACIÓN .....	23
4. CAMBIOS EN LA CANTIDAD DE DNA DE <i>P. PUTIDA</i> KT2440 BAJO ESTRÉS POR DESECACIÓN .....	27
VII. RESULTADOS .....	28
1. VIABILIDAD DE <i>P. PUTIDA</i> KT2440 BAJO ESTRÉS POR DESECACIÓN.....	28
1.1 Supervivencia a la desecación de <i>P. putida</i> KT2440 en presencia de “protectores” .....	28



1.2	<b><u>Desecación de <i>P. putida</i> KT2440, adherencia a semillas de maíz y su capacidad para colonizar la rizósfera</u></b> .....	29
1.3	<b><u>Retorno al estado cultivable de <i>P. putida</i> KT2440 después de la rehidratación con exudados rizosfericos de plantas de maíz o bajo rehidratación prolongada</u></b> .....	33
1.4	<b><u>Evaluación de la integridad de la membrana plasmática de <i>P. putida</i> KT2440 después de un proceso de desecación y rehidratación</u></b> .....	35
1.5	<b><u>Expresión de algunos genes constitutivos de <i>P. putida</i> KT2440 antes y después de la desecación.</u></b> ...	38
2.	<b>ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA EN <i>P. PUTIDA</i> KT2440 BAJO ESTRÉS POR DESECACIÓN</b> .....	40
3.	<b>IDENTIFICACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS CON LA RESISTENCIA A DESECACIÓN DE <i>P. PUTIDA</i> KT2440</b> .....	41
	<b><u>2.3 Secuenciación de genes mutagenizados en cepas de <i>P. putida</i> KT2440::miniTn5Gm sensibles a desecación.</u></b> .....	45
	<b><u>2.4 Análisis transcriptómico de <i>P. putida</i> KT2440 bajo estrés por desecación</u></b> .....	46
3.4	<b><u>Identificación de proteínas de <i>P. putida</i> KT2440 bajo estrés por desecación</u></b> .....	49
4	<b>CAMBIOS EN LA CANTIDAD DE DNA DE <i>P. PUTIDA</i> KT2440 BAJO ESTRÉS POR DESECACIÓN</b> .....	51
VIII.	<b>DISCUSIÓN</b> .....	53
1.	<b>VIABILIDAD DE <i>P. PUTIDA</i> KT2440 BAJO ESTRÉS POR DESECACIÓN</b> .....	53
2.	<b>GENES INVOLUCRADOS CON LA RESISTENCIA A DESECACIÓN DE <i>P. PUTIDA</i> KT2440</b> .....	58
3.	<b>CAMBIOS EN LA CANTIDAD DE DNA DE <i>P. PUTIDA</i> KT2440 BAJO ESTRÉS POR DESECACIÓN</b> .....	63
IX.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	64
	<b>REFERENCIAS</b> .....	66
	<b>ANEXO 1</b> .....	75
	<b>ANEXO 2</b> .....	77

## RESUMEN

El potencial de *Pseudomonas putida* KT2440 para actuar como un promotor del crecimiento de plantas o como un biorremediador de compuestos tóxicos puede verse afectado por la desecación. En el presente trabajo, se evaluó la tasa de supervivencia bacteriana (BSR) de *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación en presencia de diferentes protectores. La BSR en presencia de disacáridos no reductores, como la trehalosa, fue elevada después de 15 días de desecación, mientras que en ausencia de protector no se detectó la presencia de bacterias. El kit LIVE/DEAD mostró que las bacterias protegidas con trehalosa mantuvieron un mayor número de células verdes después de la desecación, mientras que células sin protección se observaron de color rojo, indicando daño en la membrana. Sin embargo, cuando las bacterias no protegidas sometidas a 18 días de desecación se rehidrataron por un corto tiempo con exudados rizosféricos de maíz o por 48 h con agua (rehidratación prolongada), el número de bacterias fue tan elevado como en células sin estrés, sugiriendo que las células entraron en estado viable no cultivable (VBNC) bajo estrés por desecación y regresaron al estado cultivable después de la rehidratación. Interesantemente, se observó un aumento en la intensidad del color verde de células que regresaron al estado cultivable (kit LIVE/DEAD), indicando una recuperación de la integridad de la membrana. Se determinó la actividad celular en el estado VBNC analizando la expresión de los genes 16S rRNA, *rpoN* (housekeeping), *mutL*, *mutS* (proteínas del sistema mismatch de reparación de DNA) y *oprH* (proteína de membrana externa) mediante RT-PCR, observando que todos los genes se expresaron en células cultivables y no cultivables, indicando procesos moleculares activos durante el estado VBNC. Se identificaron 12 genes relacionados con la tolerancia a desecación de *P. putida* KT2440 usando al estado VBNC como estrategia para enfrentar el estrés, 6 de los genes fueron sobre-expresados durante esta condición, proponiendo que los genes relacionados con el transporte activo (PP\_2676, PP\_0880 y PP\_1446) podrían ayudar a la detoxificación celular durante la desecación, así como tener una línea de defensa en contra del estrés oxidativo (PP\_0256), dos de los genes aún no se conoce su función (PP\_3451 y PP\_2662), sin embargo, podrían tener un papel relevante en la entrada y salida del estado VBNC; el resto de

genes identificados en cepas mutantes de *P. putida* KT2440 (*murC*, PP\_2106, , *oprD*, PP\_2107 y PP\_4252) no perdieron cultivabilidad como la cepa silvestre por lo que pueden estar involucrados en la entrada al estado VBNC. Dos proteínas fueron identificadas durante el estado VBNC TufB que podría estar favoreciendo la adaptación de las células al estrés a participando no sólo al participar en síntesis de proteínas específicas sino también en el aumento general de la traducción de proteínas necesarias para enfrentar el estrés; GroEL podría favorecer en la estabilización de proteínas evitando plegamientos erróneos que pudieran ocurrir durante la desecación. Una de las características identificadas en esta investigación es la disminución en la cantidad de DNA de células desecadas respecto a células antes del estrés, así como, el aumento del Cis-10-ácido heptadecenoico en células con 18 días de desecación tanto en rehidratación corta como en rehidratación prolongada.

## ABSTRACT

The potential of *Pseudomonas putida* KT2440 to act as a plant-growth promoter or as a bioremediator of toxic compounds can be affected by desiccation. In the present work, the bacterial survival ratio (BSR) in response to air desiccation was evaluated for *P. putida* KT2440 in the presence of different protectors. The BSR in the presence of nonreducing disaccharides, such as trehalose, was high after 15 days of desiccation stress, whereas in the absence of a protector the bacterial counts diminished to nondetectable numbers. The LIVE/DEAD staining method showed that bacteria protected with trehalose maintained increased numbers of green cells after desiccation while cells without protection were all observed to be red. This indicated that nonprotected bacteria had compromised membrane integrity. However, when nonprotected bacteria subjected to 18 days of desiccation stress were rehydrated for a short time with maize root exudates or for 48 h with water (prolonged rehydration), the bacterial counts were as high as that observed for those not subjected to desiccation stress, suggesting that the cells entered the viable but nonculturable (VBNC) state under desiccation and that they returned to a culturable state after those means of rehydration. Interestingly an increase in the green color intensity of cells that returned to a culturable state was observed using LIVE/DEAD staining method, indicating an improvement in their membrane integrity. Cellular activity in the VBNC state was determined by the expression of 16S rRNA, *rpoN* (housekeeping), *mutL*, *mutS* (encoding proteins from the mismatch repair complex), and *oprH* (encoding an outer membrane protein). All evaluated genes were expressed by both types of cells, culturable and nonculturable, indicating active molecular processes during the VBNC state. Were identified 12 genes related to tolerance to desiccation of *P. putida* KT2440 using the VBNC state as a strategy to face desiccation, 6 genes were overexpressed during this condition, proposing that genes related to active transport (PP\_2676, PP\_0880 and PP\_1446) could help cellular detoxification during desiccation, gene PP\_0256 could have a role in defense line against oxidative stress, and two genes with function unknown (PP\_3451 and PP\_2662), could have a relevant role in the entry and exit of VBNC state in *P. putida* KT2440; the rest of genes identified in mutant strains of *P. putida* KT2440 (*murC*, PP\_2106, *oprD*, PP\_2107 and PP\_4252) did not lose cultivation as the wild strain, they may be involved in the entry to the VBNC state. Two proteins were identified during the VBNC state

TufB, could be favoring the adaptation in cells under stress, participating not only in synthesis of specific proteins, also in a general increase of translation proteins necessary to face stress. GroEL could favor the stabilization proteins, avoiding erroneous folding that could occur during desiccation. One characteristics identified in cells under desiccation was the decrease in amount of DNA of dried cells with respect to cells before stress, as well as the increase in Cis-10-heptadecenoic acid in cells with 18 days of desiccation in short and prolonged rehydration.

## I. INTRODUCCIÓN

El suelo es un ambiente heterogéneo altamente complejo en el que se llevan a cabo procesos físicos, químicos y biológicos, siendo uno de los mayores reservorios de la biodiversidad microbiana y constituyendo un importante recurso para la explotación biotecnológica (Oliveira *et al.*, 2014) . La diversidad bacteriana presente en este ambiente es superior a los organismos eucariotes, estimando que en 1 cm<sup>3</sup> puede haber miles de especies de microorganismos (Torsvik and Øvreås, 2002; Maron *et al.*, 2011). Los microorganismos que habitan el suelo constituyen la base de procesos ecológicos, ciclos biogeoquímicos y cadenas tróficas ya que mantienen interacciones vitales entre sí y con organismos superiores. Al interactuar con plantas son capaces de ejercer efectos benéficos específicos como, fijación biológica de nitrógeno (Dobereiner *et al.*, 1996), solubilización de minerales (Crowley *et al.*, 1991), inducción de resistencia sistémica a patógenos, inhibición del crecimiento de organismos (Heil and Bostock, 2002), interacción sinérgica entre microorganismos del suelo (Bashan, 1998), producción de fitohormonas (Vessey, 2003) y rizoremediación de compuestos xenobióticos (Ramos *et al.*, 1998). Tomando en consideración las potencialidades agrobiotecnológicas de las bacterias, se han aplicado en cultivos de interés agrícola para aumentar su productividad (Lucy *et al.*, 2004; de Souza *et al.*, 2015), disminuir el uso desmedido de fertilizantes minerales y productos químicos, que favorezcan la reducción de la contaminación en el planeta (Parra and Cuevas, 2001). La biotecnología ha abierto nuevas posibilidades en lo referente a la aplicación de microorganismos benéficos del suelo en la promoción del crecimiento de plantas y el control biológico de patógenos. La utilización de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en la agricultura es una práctica que ha tomado fuerza en todo el mundo (Parra and Cuevas, 2001) sin embargo distintos factores pueden afectar el éxito de la inoculación de plantas con bacterias benéficas (Bashan, 1998) como: 1) la elección de una cepa competitiva para el ambiente donde será aplicado. 2) Deben ser buenas promotoras del crecimiento de las plantas a inocular. 3) Tener una colonización adecuada sin causar daños. 4) En zonas áridas y/o de escasez de agua las bacterias deben soportar periodos largos de desecación para poder interactuar con las plantas en momentos oportunos de condiciones de rehidratación.

## II. ANTECEDENTES

El fenómeno de desecación se conoce como la pérdida gradual de agua de un ecosistema produciendo que los organismos sufran el efecto adverso de sequía, sin embargo, en casos extremos, los organismos podrían perder el agua de su interior celular hasta equilibrarse con el agua presente en el ambiente (Alpert, 2005).

La desecación es un tipo de estrés que puede afectar el desarrollo de cualquier organismo, incluidas las bacterias (Potts, 1994; Potts *et al.*, 2005; Vilchez and Manzanera, 2011). En el ambiente se encuentran algunas bacterias altamente tolerantes a la desecación, como *Enterobacter* sp. UAPS03001, *Klebsiella variicola* T29A y *Paraburkholderia unamae* MTI-641, pero también existen especies bacterianas muy sensibles al estrés por desecación, como *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 y *Burkholderia sacchari* LMG 19450 (Streeter, 2003; Molina-Romero *et al.*, 2017; Pazos-rojas *et al.*, 2018). En condiciones limitadas de agua, la tolerancia a la desecación es fundamental para que cualquier especie bacteriana asociada a semillas mantenga sus características promotoras del crecimiento de plantas, que normalmente recuperan después de la rehidratación (Pazos-rojas *et al.*, 2018). Las bacterias que mejor se adapten a los procesos de desecación-rehidratación serán más competitivas en entornos con baja disponibilidad de agua, por ejemplo, bacterias tolerantes adheridas a semillas y desecadas durante 18 días al ser rehidratadas mostraron una buena colonización de la raíz durante el desarrollo de la planta (Molina-Romero *et al.*, 2017). Además, las bacterias tolerantes a la desecación tienen la capacidad de reanudar rápidamente su actividad y mostrar un aumento en los niveles de transcripción cuando el agua vuelve a estar disponible (Barnard *et al.*, 2013). La tolerancia a desecación se ha definido como la capacidad de los organismos a secarse hasta el equilibrio con el agua presente en el aire y después poder recuperar sus funciones normales mediante la rehidratación. Se considera que una célula desecada a 28°C y una humedad relativa del 50% contiene menos de un 0.1 g de agua por gramo de masa seca (contenido de agua del 10% en relación p/p) (Potts, 1994). Se propone que las bacterias mejor adaptadas para realizar los procesos de desecación-rehidratación serán más competitivas en el ambiente. Sin embargo, poco se conoce sobre las estrategias que las bacterias usan para enfrentar la desecación.

## ❖ Daños moleculares provocados por la desecación

La falta de agua en las células afecta a distintas moléculas, por ejemplo, en las proteínas puede provocar cambios conformacionales que pueden provocar un grave daño en el funcionamiento de enzimas y/o cadena transportadora de electrones, causando la acumulación de radicales libres que inducen peroxidación lipídica, desnaturalización de proteínas y mutaciones en el DNA. Uno de los principales fenómenos que afectan a este tipo de moléculas, son las reacciones de Millard provocadas por la unión de un compuesto dicarbonílico en un azúcar reductor con aminas primarias en proteínas, generando la formación de productos color marrón oscuro, conocidos como melanoidinas (Potts, 1994).

Los ácidos nucleicos son uno de los primeros sitios que sufren daño a causa de la desecación, ya que cuando existe una pérdida del agua intracelular, el DNA sufre modificaciones químicas como alquilación u oxidación y remoción de bases puricas (Potts, 1994; Billi and Potts, 2002), reacciones de Haber-Weiss y Fenton catalizadas por metales, acumulación de especies reactivas de oxígeno y radicales libres, también podrían contribuir a la modificación del DNA provocando muerte celular (Potts, 1994); por lo que la capacidad de las bacterias para poder reparar el daño provocado en el DNA a causa de la desecación resulta de vital importancia para tolerar dicho estrés.

En la membrana plasmática ocurre un empaquetamiento de lípidos a causa de la desecación probablemente generando efectos irreversibles en la viabilidad celular bacteriana (Beney *et al.*, 2004). A medida que se elimina el agua de la membrana, las cabezas polares de los lípidos se acercan entre sí, aumentando la acumulación de lípidos y las fuerzas van der Waal's entre los lípidos adyacentes, causando un incremento en la temperatura media a la cual ocurre la transición de fase de la membrana ( $T_m$ ), pasando de una fase líquida a una fase de gel, afectando su estructura y fluidez. Después de la rehidratación las membranas plasmáticas sufren una nueva transición de fase (fase de gel a fase líquida), provocando pérdida de solutos de las células (Crowe *et al.*, 1987; Mykytczuk *et al.*, 2007; Scherber *et al.*, 2009).



### ❖ *Pseudomonas putida* KT2440 y el estrés por desecación

*P. putida* KT2440 es una bacteria Gram negativa no patógena, certificada como una cepa biosegura para la clonación de genes foráneos (Bagdasarian *et al.*, 1981), su genoma consiste en un solo cromosoma circular de 6,181,863 pares de bases (pb), con un valor promedio G + C de 61.6%; es una bacteria capaz de usar diferentes compuestos aromáticos como fuente de carbono, (Ramos-González *et al.*, 1994), metabolizar compuestos xenobióticos, además de poseer una buena capacidad colonizadora de raíces de plantas como maíz, trigo, fresa, caña de azúcar y espinacas (Espinosa-Urgel *et al.*, 2002) y es capaz de promover el crecimiento y salud de las plantas que coloniza (Matilla *et al.*, 2010; Molina-Romero *et al.*, 2017). *P. putida* KT2440 ha sido ampliamente utilizada como modelo en estudios de biodegradación y adaptación ambiental (Wackett, 2003; Dos Santos *et al.*, 2004), mostrando sistemas complejos de quimiosensores, transducción de señales, regulación genética y respuestas al estrés ambiental que explican su alta versatilidad metabólica y adaptativa (Dos Santos *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2011; Pineda-Molina *et al.*, 2012; Krell *et al.*, 2013); definiéndola como la bacteria oportunista nutricional por excelencia y un paradigma dentro de los microorganismos metabólicamente versátiles capaz de reciclar desechos orgánicos en compartimentos aeróbicos y microaerófilos del medio ambiente (Timmis, 2002). Se ha propuesto que la cepa KT2440 de *P. putida* ha desarrollado de manera independiente su propio repertorio de factores de transcripción, indicando que un factor importante en la adaptación de un organismo a un nuevo entorno es la aparición de un conjunto distinto de estas proteínas (Nelson *et al.*, 2002). A pesar de esta versatilidad, la supervivencia de *P. putida* KT2440 disminuye drásticamente después de la pérdida de agua, como se ha reportado en estudios de liofilización y desecación (Manzanera *et al.*, 2002; Muñoz-Rojas *et al.*, 2006). El potencial de *P. putida* KT2440 para su uso en biorremediación de suelos y promoción de crecimiento de plantas puede verse afectado por la falta de agua, fluctuaciones en la temperatura y pH, alta salinidad, baja disponibilidad de nutrientes y desecación, siendo estas condiciones estresantes factores limitantes que determinan la supervivencia bacteriana (Roszak and Colwell, 1987; Vilchez and Manzanera, 2011; He *et al.*, 2017).

## ❖ Estado Viable no Cultivable (VBNC) en bacterias

Se sabe que algunas bacterias entran en un estado viable pero no cultivable (VBNC) en respuesta a condiciones ambientales estresantes que pueden ser perjudiciales para la supervivencia celular, como la radiación UV, la presencia de metales pesados, la limitación de nutrientes, bajas temperaturas, salinidad, desecación y oxidación (Oliver, 2010; Stokell and Steck, 2012; Vriezen *et al.*, 2012; Orruño *et al.*, 2017), durante este estado las bacterias permanecen viables y metabólicamente activas, pero no pueden crecer en su medio de cultivo habitual (Oliver, 2000; Dopp *et al.*, 2017). En el estado VBNC las células sufren cambios metabólicos, como reducción en el transporte de nutrientes, tasas de respiración y síntesis macromolecular (Oliver, 2005) y existe una expresión continua de genes (Trevors, 2011); algunos estudios muestran que cuando una bacteria entra al estado VBNC inducido por estrés térmico es capaz de mantener ciertos genes encendidos que están ejerciendo funciones vitales (Pierobon *et al.*, 2000; Lleò *et al.*, 2001; Yaron and Matthews, 2002a); por lo que se ha propuesto como una prueba definitiva de que las células permanecen metabólicamente activas y no están muertas (Oliver, 2010). En algunos casos, la eliminación de los factores de estrés o la provisión de condiciones adecuadas para las células en estado VBNC puede restaurar su capacidad de crecimiento y, por lo tanto, su capacidad de crecer nuevamente en su medio de cultivo habitual (Zhao *et al.*, 2017; Robben *et al.*, 2018). Se ha informado que al menos ochenta y cinco especies bacterianas ingresan al estado VBNC siendo la mayoría especies patógenas (Zhao *et al.*, 2017), pero el comportamiento de los microorganismos benéficos asociados con las plantas aún debe investigarse a fondo. Actualmente es escaso el conocimiento de los genes que promueven el estado viable no cultivable, es decir aquellos genes que son esenciales para que las bacterias entren a este estado y sean capaces de retornar al estado cultivable.

Los estudios de desecación ambiental son importantes para entender el nivel de tolerancia de los microorganismos, y como su potencial benéfico podría verse afectado por la limitación de agua; por lo que, en el presente trabajo, se usó a *P. putida* KT2440 como modelo de bacteria que entra al estado viable no cultivable y retorna al estado viable cultivable como estrategia de tolerancia a la desecación, estudiando los cambios que sufre en su membrana plasmática y DNA durante la ausencia de agua, así como los genes que codifican para esta resistencia.

### III. JUSTIFICACIÓN

Se sabe que la poca disponibilidad de agua es uno de los principales factores limitantes en el crecimiento de plantas y microorganismos, por lo tanto, un factor crítico en la productividad agrícola. Esta situación puede afectar la supervivencia bacteriana siendo una limitante importante para la efectividad de una bacteria en la biorremediación de suelos y en la estimulación de crecimiento en plantas. *P. putida* KT2440 es una bacteria que ha desarrollado diferentes estrategias para enfrentar a la desecación; como el uso de protectores y la entrada al estado VBNC. En este trabajo se plantea determinar la viabilidad de esta bacteria, identificar los genes relacionados con la desecación, así como evaluar algunos cambios moleculares que ocurren durante un proceso de desecación extrema-rehidratación.

### IV. HIPÓTESIS

El conocimiento de los cambios moleculares y los genes implicados en la tolerancia a desecación de *P. putida* KT2440 podría sugerir la forma en que esta bacteria enfrenta la desecación

### V. OBJETIVOS

#### Objetivo general

Evaluar los cambios moleculares que ocurren durante la desecación-rehidratación de *P. putida* KT2440.

#### Objetivos particulares

- Determinar la viabilidad de *P. putida* KT2440 de células no cultivables después de ser enfrentada a un proceso de desecación extrema-rehidratación. (Artículo publicado)
- Analizar el contenido de ácidos grasos de *P. putida* KT2440 cuando es enfrentada a un proceso de desecación extrema-rehidratación.
- Identificar genes involucrados con la resistencia a la desecación de *P. putida* KT2440
- Evaluar cambios en el DNA de *P. putida* KT2440 cuando es enfrentada a un proceso de desecación extrema-rehidratación.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Viabilidad de *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación

#### 1.1 Crecimiento bacteriano y experimentos de desecación

Células de *P. putida* KT2440 fueron crecidas hasta fase estacionaria en medio líquido LB (Luria-Bertani) suplementado con 100µl/mL de cloranfenicol (LB-Cm<sup>100</sup>) (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006). Una vez obtenida la suspensión bacteriana se tomaron 360 mL para dividirlo en alícuotas de 15 mL, cada alícuota fue centrifugada a 5000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante fue removido y el pellet fue resuspendido en el mismo volumen (15mL) con agua destilada estéril; este proceso se repitió dos veces, posterior al segundo lavado cada alícuota fue resuspendida con 15mL de cada protector que se utilizó (Tabla 1), usando como control agua. Cada suspensión fue alícuotada en microtubos de 1.5mL de capacidad, colocando 500 µL de la suspensión, todos los tubos fueron tapados con algodón estéril. Cinco muestras de cada tratamiento fueron usadas para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC/mL) contenidas en la suspensión antes de ser sometidas a desecación, usando la metodología de goteo en placa por sellado masivo (GSPM) (Corral-Lugo *et al.*, 2012). Las condiciones de desecación fueron 30 °C y 50% de humedad relativa (HR). El número de UFC/mL fue determinado cada 3 días posteriores del inicio de la desecación (DPID), rehidratando durante 20 minutos 5 muestras con 500 µL de agua destilada estéril. El medio de cultivo usado para la cuantificación bacteriana fue LB-Cm<sup>100</sup>. La tasa de supervivencia bacteriana (BSR) (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006), fue calculada como la relación logarítmica del número de bacterias presentes en la suspensión después de la desecación (DD) más uno respecto al logaritmo del número de bacterias determinadas antes de la desecación (AD), todo multiplicado por 100. Como se muestra en la siguiente ecuación:

$$BSR = \frac{(\log(\text{UFC/ml DD} + 1)) \times 100}{\log(\text{UFC/ml A.D})}$$

Un valor de 100 en la BSR indica que todas las bacterias sobrevivieron después de la desecación, mientras que un valor de 0 indica que ninguna bacteria sobrevivió después del estrés. Todas las muestras fueron pesadas antes de la desecación y después de la desecación para calcular la pérdida de agua, determinando que a los 5 DPID todas las muestras alcanzaron la desecación completa.

## 1.2 Adherencia de *P. putida* KT2440 a semillas de maíz germinado después de la desecación.

Células de *P. putida* KT2440 fueron desecadas en presencia o ausencia de protector (trehalosa 200mM), siguiendo la metodología descrita anteriormente; 18 días posteriores a la desecación, un total de 25 muestras desecadas (con o sin protector) fueron rehidratadas con 500  $\mu$ L de agua destilada estéril durante 20 minutos, el volumen total (12.5mL) fue transferido a un tubo falcon de 15 mL, en cada tubo (con o sin protector) se colocaron 20 semillas germinadas de maíz axénico (Morales-García *et al.*, 2011), en ambos tubos las semillas axénicas germinadas fueron inoculadas durante una hora. Cinco semillas de cada tratamiento fueron usadas para determinar el número de bacterias adheridas a los brotes de maíz usando el método GSPM (Morales-García *et al.*, 2011; Molina-Romero *et al.*, 2017; Pazos-rojas *et al.*, 2018). El resto de semillas axénicas fueron transferidas a tubos falcon de 50 mL los cuales contenían 6.4 g de vermiculita estéril, cada tubo fue regado con 25mL de agua destilada estéril, para posteriormente ser colocados en una cámara de plantas durante 15 días a 25 °C y 80% de humedad relativa con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. Durante el periodo de crecimiento de plantas, cada 3 días los tubos falcon fueron regados con agua destilada estéril para mantener la humedad en el sustrato y se permitiera un adecuado crecimiento de las plantas.

Transcurridos los 15 días se colectaron las muestras de rizósfera de cada tratamiento, en concordancia a la metodología descrita previamente (Muñoz-Rojas and Caballero-Mellado, 2003; Rodríguez-Andrade *et al.*, 2015; Pazos-rojas *et al.*, 2018). Para la recolección, la vermiculita adherida a las raíces, considerada como rizósfera, fue resuspendida en agua destilada estéril en una proporción 1:10 peso/volumen; la suspensión fue vortexeada durante 3 minutos para inmediatamente iniciar diluciones seriadas. El número de bacterias presentes en la rizósfera se determinó usando el método GSPM usando como medio de cultivo LB-Cm<sup>100</sup> sólido. En adición a la colonización la integridad de membrana fue evaluada en cada tratamiento (con o sin protector) y en cada etapa experimental en donde se evaluó la densidad bacteriana (antes de la desecación, 18 DPID con 20 minutos de rehidratación y la suspensión bacteriana con la que se inocularon semillas de maíz axénico). En cada una de las determinaciones se calculó la intensidad media de fluorescencia MFI por sus siglas en inglés. La metodología para realizar la determinación de daño

a membrana y cálculo de la MFI se describe en la sección “1.5 Daño a membrana en *P. putida* KT2440 durante la desecación” “

### **1.3 Rehidratación de *P. putida* KT2440 con exudados rizosfericos de maíz.**

Para la realización de este experimento, se obtuvieron dos tipos de exudados:

- 1) Exudados de maíz rojo en las primeras etapas de crecimiento, en donde 10 semillas de maíz axénicas se colocaron a germinar en placas de agar-agua durante 2 días, posteriormente las semillas fueron retiradas y la placa de agar agua se lavó con 5 mL de agua destilada estéril, para coleccionar los exudados rizosfericos depositados. Los exudados coleccionados fueron almacenados a -20 °C hasta su posterior uso.
- 2) Exudados rizosfericos de plantas con 12 días de crecimiento. Este tipo de exudados rizosfericos fueron obtenidos a partir de sistemas hidropónicos esterilizados previamente, cada sistema contenía 300 mL de medio líquido MS-J (Morales-García *et al.*, 2011), dentro de cada sistema se instaló un anillo metálico, y sobre este anillo se colocó una semilla de maíz axénico germinado a modo que las raíces de las semillas tuvieran contacto con el medio MS-J, permitiendo la acumulación de exudados rizosfericos en el medio, todos los sistemas fueron tapados con algodón estéril. Las plantas se dejaron crecer durante 12 días en cámara de plantas a 25 °C y 80% de humedad relativa con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. Transcurridos los 12 días de crecimiento de las plantas, los exudados fueron coleccionados y almacenados a -20 °C hasta su posterior uso.

Ambos tipos de exudados fueron usados para rehidratar células de *P. putida* KT2440 desecadas durante 18 días siguiendo la metodología antes descrita; para cada tipo de exudado se prepararon 5 muestras. El número de bacterias antes y después de la desecación se determinó con el método GSPM usando 5 muestras independientes en cada tratamiento. Las células desecadas fueron rehidratadas durante 20 minutos, 3, 6, 9, 12, 24, 27, 30 y 48 horas con cada uno de los tipos de exudados obtenidos; como control se usaron muestras que fueron rehidratadas en los mismos tiempos con agua destilada estéril.

#### **1.4 Crecimiento de *P. putida* KT2440 en presencia de exudados rizosféricos de maíz bajo condiciones estáticas**

Para evaluar si *P. putida* KT2440 puede usar los exudados rizosféricos de plantas de maíz como fuente de carbono y crecer en condiciones estáticas, similar al procedimiento utilizado en los experimentos de rehidratación, las células se pusieron a crecer hasta fase estacionaria en medio LB-Cm<sup>100</sup> líquido (dos matraces de 50 mL conteniendo 15 mL de medio de cultivo). La suspensión bacteriana resultante fue lavada y resuspendida en el mismo volumen (15 mL) una con exudados rizosféricos de maíz y la otra con agua destilada estéril como control. A cada suspensión se le realizaron diluciones seriadas (1:10) para cuantificar el número de bacterias. Para el tratamiento con exudados rizosféricos, las diluciones bacterianas se realizaron utilizando los exudados. Los tubos de cada dilución se mantuvieron a temperatura ambiente en condiciones estáticas durante 24 y 48 h, para posteriormente determinar el número de bacterias en cada dilución en estos tiempos experimentales.

#### **1.5 Daño a membrana en *P. putida* KT2440 durante la desecación**

Para determinar el daño a membrana en *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación, se utilizó microscopía de fluorescencia, para observar células teñidas con el kit L7007 LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight™ Bacterial Viability Kit for microscopy (Molecular Probes Invitrogen Detection Technologies). El kit utiliza dos fluoróforos, el SYTO<sup>®</sup>9 que tiñe de color verde las células indicando que están vivas y el ioduro de propidio las tiñe de color rojo, señalando que existe daño en membrana y que las células están muertas.

Para llevar a cabo las pruebas con el kit antes mencionado, células de *P. putida* KT2440 fueron crecidas hasta fase estacionaria y puestas a desecar durante 18 días, siguiendo la metodología descrita previamente. La integridad de la membrana fue evaluada antes de la desecación (5 muestras) y en determinados momentos después de haber iniciado la desecación (3,6,9,12,15 y 18 DDID), rehidratando 5 muestras en cada tiempo durante 20 minutos. El número de bacterias fue determinado antes y en cada tiempo evaluado después de haber iniciado la desecación para poder estimar la BSR. Adicionalmente en muestras que estuvieron en desecación por 18 días la prueba de daño a membrana también se realizó después de 24 y 48 horas de rehidratación, estimando el número de bacterias para realizar el cálculo de la BSR. Todas las

muestras fueron observadas con el microscopio de fluorescencia VE-146YT a una magnificación de 100X usando el filtro G (excitación 500-550nm) para ver bacterias teñidas de rojo y el filtro B (excitación 420-490nm) para observar células verdes, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante del kit LIVE/DEAD.

Todas las imágenes obtenidas se examinaron mediante gráficos de intensidad de fluorescencia (MFI) para evaluar la distribución de yoduro de propidio y SYTO® 9 solo o en combinación (MERGE), trazando una línea aleatoria a través de las células. La información de intensidad de píxel por canal de fluorescencia se extrajo con el software ImageJ (v1.43u, NIH, EE. UU., Dominio público); cada gráfico se generó a partir de un mínimo de quince bacterias seleccionadas al azar para cada condición experimental probada en esta investigación, utilizando Microsoft® Excel® (v14.3.9, Microsoft Corporation, Redmond, WA, EE. UU.). Los datos de MFI fueron examinados secuencialmente por ImageJ y graficados usando el software Prism.

### **1.6 Análisis TEM de *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación**

El análisis de microscopía electrónica de transmisión se realizó en muestras de células antes ser sometidas a estrés, 6, 12 y 18 DDID teniendo 20 minutos de rehidratación. La metodología para realizar la TEM se dividió en 4 etapas:

- 1) Fijación de la muestra con una mezcla de gluteraldehído (2.5%), paraformaldehído (4%) y tampón de fosfatos 0.0.5M.
- 2) Lavado de las muestras con tampón fosfatos
- 3) Deshidratación de la muestra con alcohol a diferentes concentraciones (15, 30, 50, 70, 90 y 100%), iniciando los lavados con la menor concentración y finalizando con el más concentrado.
- 4) Inclusión de la muestra en la resina LR White (Sigma-Aldrich, iniciando con una dilución 2:1 (alcohol-resina) durante 6 horas a 4 °C, posteriormente la solución fue descartada y se colocó una nueva solución 1:1 (alcohol-resina) durante el mismo tiempo y temperatura. Finalmente la solución fue descartada y sustituida por resina pura, dejando 24 horas a 4 °C, este paso se repitió dos veces para después colocar las muestras a polimerizar a 60 °C durante 24 horas.



Después de la inclusión las muestras fueron microtomizadas para realizar el análisis de contraste y fueron observadas con TEM

### 1.7 Expresión de algunos genes constitutivos en *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación

Células de *P. putida* KT2440 fueron sometidas a desecación durante 18 días como se describió anteriormente; a muestras antes de la desecación y muestras a los 6, 12 y 18 DPID respectivamente se les realizó extracción de RNA (3 réplicas de 1.5mL) por el método de fenol caliente (Baez *et al.*, 2009). Ver metodología en Anexo 1.

Al RNA obtenido se le realizó un tratamiento con el kit Invitrogen™ TURBO DNA-free, para eliminar contaminaciones con DNA genómico que pudiera haber quedado después de la extracción. La integridad del RNA fue evaluada en un gel de agarosa al 2% y su concentración fue determinada con el espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000/2000c. El cDNA de cada gen evaluado fue obtenido usando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), usando 2µg de RNA como templado y una concentración de 10µM de los oligonucleótidos específicos reversos (Tabla 1), determinando la concentración final del cDNA con el espectrofotómetro antes mencionado. Las condiciones de la retrotranscripción fueron:

25 °C 10 '  
 37 °C 120'  
 85 °C 5'  
 4 °C 10'

Para amplificar cada gen se usó como templado el cDNA obtenido para llevar a cabo una reacción de PCR de punto final bajo las siguientes condiciones

95 °C 5'  
 95 °C 30"  
 63 °C 30"  
72 °C 20" } 25 ciclos  
 72 °C 8'  
 4 °C 10'

Los productos amplificados fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% (30 minutos, 100 volts) usando GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotum)

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para el análisis de RT-PCR y RT-qPCR

Gen	Producto	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
<i>oprH</i>	Porina de membrana externa	GCCGCTACTACATGACCTATG	CCGAACAGCTTGGTGGTAT
<i>mutL</i>	Sistema mismatch de reparación de DNA	GCAGCTCAAGGGTATCTACATC	CTTGAGGCGCTCGTACATTAT
<i>mutS</i>	Sistema mismatch de reparación de DNA	CACCCACTACTTCGAACTGAC	GGAACACGATGCGTTCATTG
<i>16S RNA</i>	16S RNA	TGTGAAGAAGGTCTTCGGATTG	CAGAGTTAGCCGGTGCTTATT
<i>rpoN</i>	Factor sigma $\sigma$ 54	CTGGTAGAACTGAACCAGGAAG	GTTGCGCATGAAGGTGTTG
PP_2676	Proteína putativa de unión en el periplasma	GTACGCCTGCAACTGATCT	TCGGCCAATTGCTGATGA
PP_2662	Proteína conservada	CCAACTACCTAGGCTTCAACAT	GTTGGTTTCACTGTCGTTGATG
PP_3451	Proteína conservada	TGGACAAGCCGTTGCATATC	CTGCCACCACACAGTCAAG
PP_0880	dipeptido-dppC-Transportador ABC permeasa	CACCTGGCAGTTCATCCT	TCAGTGACATCACCACTGAC
PP_1446	receptor dependiente de TonB	TCAGCTCGGTCAAGGTAGAT	GCTTCGTAGCCCTTGTCTT
PP_0256	molibdopterina oxidoreductasa	CTGACCAGGCCGAATTCTATAC	GAGCAGTCAGGGAAGTTGTT

A partir del mismo cDNA obtenido, se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real usando el sistema Applied Biosystems™ 7500 Fast Real Time PCR. Las reacciones se prepararon usando SYBR Green PCR Master Mix. Cada reacción contenía 10 ng de cDNA y una concentración 6  $\mu$ M de cada cebador (forward y reverse), para generar un volumen final de reacción de 20  $\mu$ L. Las reacciones de RT-qPCR se realizaron por triplicado en placas para PCR de 96 pocillos bajo las siguientes condiciones:

<u>95 °C 5'</u>	}	30 ciclos
<u>95 °C 30''</u>		
<u>63 °C 30''</u>		

Los datos obtenidos fueron analizados por el método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Livak and Schmittgen, 2001), bajo la siguiente relación:

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

Dónde DD es después de la desecación y AD antes de la desecación. La expresión del gen *rpoN* fue usada como control endógeno para normalizar la cantidad de mRNA obtenido de cada gen explorado. Los datos de expresión obtenidos en cada tiempo se normalizaron con la expresión obtenida de cada gen antes de la desecación.

Adicionalmente siguiendo esta metodología se comprobó la sobre-expresión de los genes identificados por microarreglos, de células de *P. putida* KT2440 antes de la desecación y 18 DPID con 20 minutos de rehidratación, usando los oligonucleótidos descritos en la Tabla 1.

## **2. Análisis del contenido de ácidos grasos de membrana plasmática en *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación**

Siguiendo la metodología descrita anteriormente para desecar, células de *P. putida* fueron desecadas durante 18 días, teniendo 2 tiempos de rehidratación (20 minutos y 24 horas), 100 réplicas (500 µL) por cada tiempo evaluado, para hacer una solución final de 50mL por tiempo; a células antes y después de la desecación se les realizó extracción de lípidos (Bligh and Dyer, 1959)(ver Anexo 2). Los lípidos totales fueron analizados mediante cromatografía de gases masa (Aligent Technologies 7890A GC system y Aligent Technologies 5975C VL MSD with Triple-Axis Detector) usando la columna Agilent Technologies, Inc. 1909 S-433 HP-5MS 30mx0.250mm 0.25 Micron -60 to 325/350C SN: USA 436532H, con una rampa de temperatura de 56°C 4': 194°C 15.5': 290°C 35.1' y el inyector que se utilizó fue un Split / Splitless

## **3. Identificación de genes involucrados con la resistencia a desecación de *P. putida* KT2440**

### **3.1 Mutagénesis al azar en *P. putida* KT2440**

En esta investigación se generó una banca de mutantes mediante la técnica de mutagénesis al azar usando una conjugación biparental, teniendo a *P. putida* KT2440 como cepa receptora y *Escherichia coli* S17 λpir-pUTGm (Gentamicina) como cepa donadora del plásmido pUTGm en el que se encuentra inserto el minitransposon miniTn5 que se insertó en una región al azar del genoma. El plásmido pUTGm tiene un origen de replicación R6K, por lo que su replicación es

dependiente de la proteína  $\lambda$ pir, siendo un plásmido suicida en fondos genéticos carentes del gen que codifica para dicha proteína. Para realizar los ensayos de mutagénesis se siguió la metodología descrita en la figura 1. La selección de las cepas mutantes se realizó en medio MM9-Citrato-Gm<sup>50</sup> Cm<sup>100</sup>; medio donde no crece la cepa donadora ni la cepa receptora. Las cepas mutantes se conservaron a -80°C en glicerol al 50%.

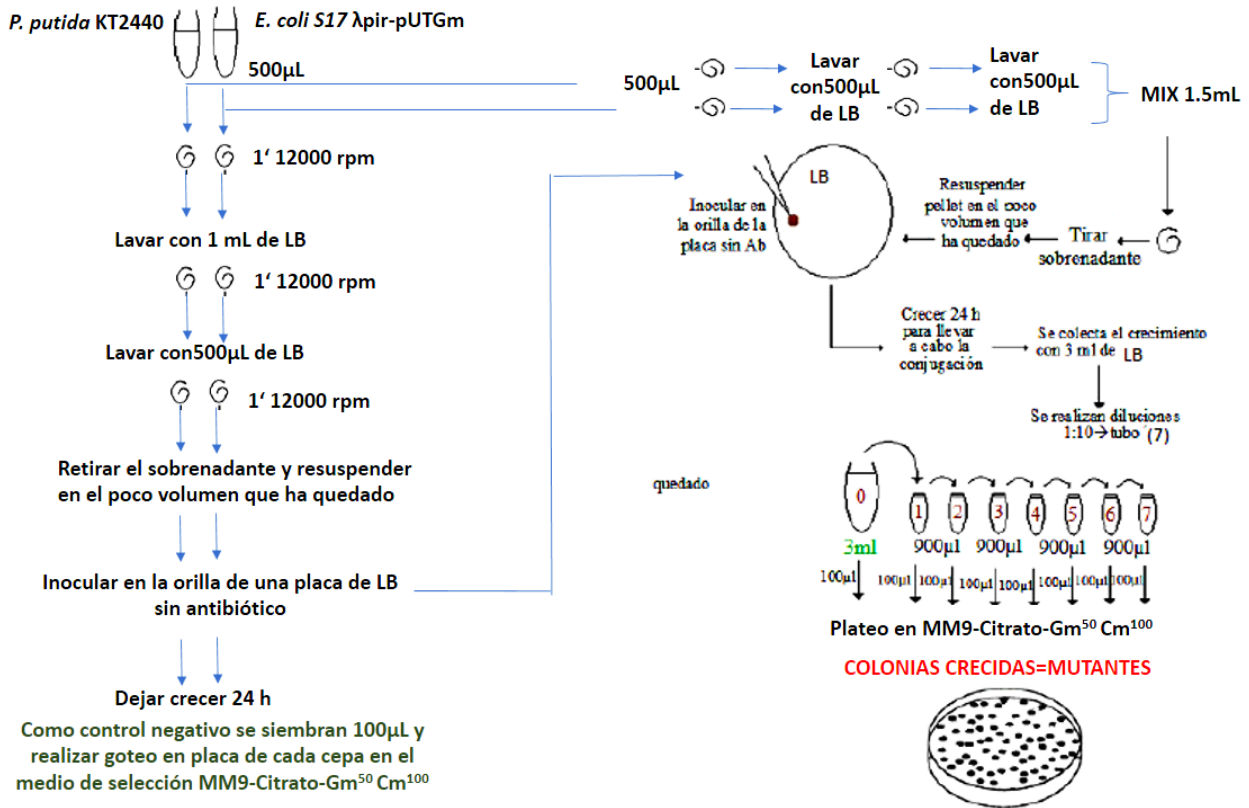


Figura 1. Metodología para realizar conjugación biparental

### 3.1.1 Generación de una colección de mutantes de *P. putida* KT2440 por mutagénesis al azar usando un sofisticado robot picacolonia

Se realizó una conjugación biparental por 6 horas en membranas de celulosa (Fig. 2), en donde el transposón miniTn5Gm contenido en la cepa *E. coli* S17 $\lambda$ pir fue transferido a la cepa receptora *P. putida* KT2440, posteriormente las cepas transconjugantes fueron dispuestas en 20 mL de LB y dispersadas en una placa Petri cuadrada de 24.5 cm. Para la individualización de las colonias, se utilizó un sofisticado dispositivo selector de colonias "QpiX2" el cual individualiza cada una de las colonias a partir de medio sólido usando un cabezal con 96 palillos (Fig. 3)

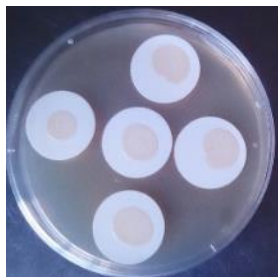


Figura. 2 Conjugación biparental

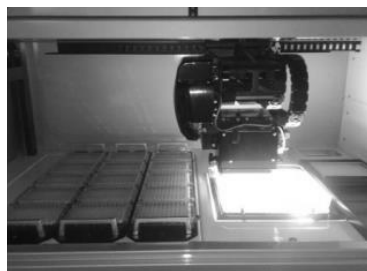


Figura. 3 Robot pica colonias Qpix2

### 3.1.2 Determinación y comprobación de la inserción del cassette de Gm en *P. putida* KT2440::miniTn5Gm

Para comprobar que el cassette de Gm se insertó al azar en el genoma de *P. putida* KT2440::miniTn5, se realizó extracción de DNA con el kit Wizard® Genomic DNA Purification a 20 cepas mutantes (tomadas al azar), la cepa *E.coli* S17λpir-pUTGm (control positivo) y *P.putida* KT2440 (control negativo). El DNA obtenido se usó como templado para amplificar por PCR la secuencia correspondiente a la resistencia de Gm, usando los siguientes oligos

Forward 5'TCCATGCGGGCTGCTCTTGAT<sup>3'</sup>

Reverse 5'ACCTGGCGGCGTTGTGAC<sup>3'</sup>

Las condiciones para realizar la PCR fueron

95 °C 5'	} 30 ciclos
95 °C 30"	
57 °C 30"	
72 °C 1'	
72 °C 4'	
20 °C 10'	

Como control adicional se realizó la extracción de DNA plasmídico (QIAprep®Spin Minprep kit) a las cepas mutantes, *E.coli* S17λpir-pUTGm (control positivo) y *P.putida* KT2440 (control negativo), para corroborar que el pUTGm solo estaba presente en la cepa donadora y no en las mutantes.

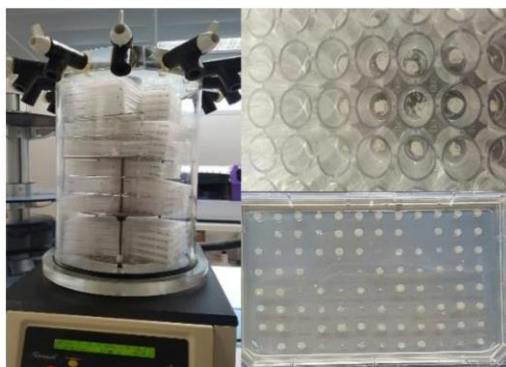
Los productos amplificados y la extracción de plásmido fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% (30 minutos, 100 volts) usando GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotum).

### 3.1.3 Evaluación de mutantes de *P. putida* KT2440::miniTn5Gm en su tolerancia a desecación.

#### Experimentos de desecación ambiental

Mutantes de *P. putida* KT2440::miniTn5Gm fueron sometidas a desecación durante 18 días siguiendo el procedimiento antes descrito. Transcurrido este tiempo las células fueron rehidratadas en tres momentos 20 minutos, 24 y 48 horas. En cada momento de rehidratación las células fueron sembradas en LB Cm<sup>(100)</sup>-Gm<sup>(50)</sup> con ayuda de un replicador. Las mutantes seleccionadas fueron las sensibles a desecación, lo que se reflejó con la incapacidad de retornar al estado viable cultivable con la rehidratación prolongada. A las cepas mutantes altamente sensibles a desecación de *P. putida* KT2440::miniTn5Gm se les corroboró la ausencia del plásmido pUTGm y la presencia del cassette de gentamicina por PCR, siguiendo la metodología antes descrita.

Otra metodología que se usó para seleccionar mutantes de *P. putida* KT2440::miniTn5Gm obtenidas por el robot pica colonias, consistió en hacer una primera selección bajo estrés por liofilización (desecación rápida). Para realizar estos experimentos las cepas fueron crecidas durante 24 horas en placas con 96 pocillos conteniendo medio líquido LBCm-Gm<sup>50</sup>, posteriormente se midió la densidad óptica y se procedió a realizar un lavado, las células fueron resuspendidas en agua destilada estéril y congeladas a -80°C por 1 hora para posteriormente ser liofilizadas (Fig. 4). Las muestras perdieron toda el agua en aproximadamente 48 horas. Las cepas consideradas como resistentes fueron las que con un tiempo mínimo de rehidratación (20 minutos) crecieron en el medio de selección, las cepas sensibles fueron las que con un tiempo máximo de rehidratación (24 horas) no crecieron en el medio de selección.



**Figura 4.** Liofilización y selección de cepas de *P. putida* KT2440::miniTn5Gm

Las cepas seleccionadas mediante el ensayo de liofilización fueron sometidas a un segundo análisis de desecación ambiental en placas multipozos (Fig. 5) por 12 días con 2 tiempos de rehidratación (20 minutos y 24 horas), tomando el mismo criterio antes mencionado para seleccionar las cepas sensibles y resistentes. Las condiciones de desecación fueron 30°C y 45% de humedad relativa



Figura 5. Desecación ambiental de *P. putida* KT2440::miniTn5

### 3.1.4 Determinación del sitio de inserción del miniTn5 en cepas *P. putida* KT2440::miniTn5Gm sensibles y resistentes a desecación

Para determinar el sitio de inserción del miniTn5 en el genoma de cepas mutantes resistentes y sensibles a la desecación, se usó la técnica de PCR's arbitrarias, esta metodología consiste en dos rondas secuenciales de PCR para amplificar las secuencias de nucleótidos que flanquean los sitios de inserción del miniTn5Gm (Hingston *et al.*, 2015). Para realizar esta técnica se utilizan cebadores de inicio para el cassette de gentamicina y cebadores de paro escogidos al azar, los cuales proporcionaron amplificados de diferentes tamaños. Las condiciones de las 2 rondas de PCR y las secuencias de oligonucleótidos usados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Componentes y condiciones para realizar las PCR's arbitrarias

Primera ronda de PCR		Segunda ronda de PCR																					
Reacción	Condiciones	Reacción	Condiciones																				
DNA .....1µL Buffer.....2.5 µL dNTP's.....0.5 µL Tnext2.....1 µL ARB1A.....0.5µL CEKGB.....0.5µL Taq Polimerasa.....0.12 µL H <sub>2</sub> O.....18.12 µL	<table border="0"> <tr> <td>95 °C 5'</td> <td rowspan="3">} 6 ciclos</td> </tr> <tr> <td>95 °C 1'</td> </tr> <tr> <td>37 °C 1'</td> </tr> <tr> <td>72 °C 1'</td> <td rowspan="6">} 30ciclos</td> </tr> <tr> <td>95 °C 5'</td> </tr> <tr> <td>95 °C 30"</td> </tr> <tr> <td>50 °C 30"</td> </tr> <tr> <td>72 °C 1'</td> </tr> <tr> <td>72 °C 7'</td> </tr> <tr> <td>20 °C 20'</td> <td></td> </tr> </table>	95 °C 5'	} 6 ciclos	95 °C 1'	37 °C 1'	72 °C 1'	} 30ciclos	95 °C 5'	95 °C 30"	50 °C 30"	72 °C 1'	72 °C 7'	20 °C 20'		DNA .....3µL Buffer.....2.5 µL dNTP's.....0.5 µL TNTint.....1 µL ARB2A.....1µL Taq Polimerasa.....0.12 µL H <sub>2</sub> O.....18.12 µL  Nota: El DNA que se utiliza en esta reacción es el producto de PCR obtenido de la primera ronda	<table border="0"> <tr> <td>95 °C 5'</td> <td rowspan="6">} 30ciclos</td> </tr> <tr> <td>95 °C 30"</td> </tr> <tr> <td>57 °C 30"</td> </tr> <tr> <td>72 °C 1'</td> </tr> <tr> <td>72 °C 7'</td> </tr> <tr> <td>20 °C 20'</td> </tr> </table>	95 °C 5'	} 30ciclos	95 °C 30"	57 °C 30"	72 °C 1'	72 °C 7'	20 °C 20'
95 °C 5'	} 6 ciclos																						
95 °C 1'																							
37 °C 1'																							
72 °C 1'	} 30ciclos																						
95 °C 5'																							
95 °C 30"																							
50 °C 30"																							
72 °C 1'																							
72 °C 7'																							
20 °C 20'																							
95 °C 5'	} 30ciclos																						
95 °C 30"																							
57 °C 30"																							
72 °C 1'																							
72 °C 7'																							
20 °C 20'																							
Oligonucleótidos		Oligonucleótidos																					
<b>TNTEXT2</b> 5'CTTTATTGATTCCATTT3' <b>ARB1A</b> 5'CCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNN3' <b>CEKGB2B</b> 5'GGCCAGGCGTCGACTAGTACNNNNNNNN3'		<b>TNTINT</b> 5'GACCTGCAGGCATGCAAGCTTCGG3' <b>ARB2A</b> 5'CCACGCGTCGACTAGTAC3'																					

Después de la segunda ronda de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (30 min, 100volts) colocando todo el volumen de la reacción. La banda más representativa observada en el gel (200-600pb) fue cortada y purificada con el kit “Zymoclean™ Gel DNA Recovery”, se tomaron 15 µL del producto recuperado 1.5 µL del oligo TNTINT (5 µM) para enviarse a secuenciar. Las secuencias obtenidas fueron analizadas y comparadas mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

### 3.2 Análisis transcriptómico de *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación

Para realizar este análisis se inició con la desecación durante 18 días de células de *P. putida* KT2440 siguiendo la metodología descrita anteriormente, posteriormente las muestras fueron rehidratadas en dos momentos, 20 minutos (30 muestras) y 24 horas (30 muestras). La preparación y análisis de los microarreglos se llevó a cabo en 5 etapas.

#### ○ Etapa 1 Extracción de RNA total

Las muestras obtenidas antes y después de la desecación se rehidrataron de acuerdo al tiempo a explorar y se homogenizaron para formar una suspensión de 15 mL. La suspensión



resultante fue lavada, se retiró el sobrenadante y a cada muestra se le añadió TRI Reagent (Ambion), en una proporción de 1mL por cada 5-7 DO<sub>660</sub> (1.6mL a un tubo con 10 DO<sub>660</sub> totales), se mezcló perfectamente con ayuda de una micropipeta y el volumen total fue transferido a un tubo de 2mL precalentado a 65 °C incubándose durante 10 minutos a 65 °C, posteriormente se centrifugó a máxima velocidad durante 10 minutos a 4°C, transfiriendo el sobrenadante a un tubo nuevo de 2mL. Para la separación de fases se utilizó el BCP (1-bromo-3-cloropropano), añadiendo al sobrenadante 160 µL del reactivo dejando a temperatura ambiente por 15 minutos, posteriormente se centrifugó a máxima velocidad 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

Para la precipitación del RNA se añadieron 700 µL de isopropanol dejando a temperatura ambiente durante 10 minutos, transcurrido el tiempo las muestras se centrifugaron a máxima velocidad durante 8 minutos a 4 °C, el sobrenadante fue descartado para realizar un lavado con 1 mL de etanol al 70% (agua DEPC), las muestras se centrifugaron a máxima velocidad por 5 minutos a 4 °C, el sobrenadante fue retirado para volver a centrifugar bajo las mismas condiciones, para quitar el etanol de las paredes, las muestras se colocaron a secar a 50 °C aproximadamente 15-20 minutos

La solubilización del RNA total se realizó en 80 µL de agua DEPC a 55 °C durante 15 minutos. Para eliminar restos de DNA se realizó un tratamiento con el kit Invitrogen™ TURBO DNA-free, siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración del RNA total se midió con ayuda del espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop™ OneC Microvolume UV-Vis. La integridad del RNA fue verificada mediante electroforesis en gel desnaturalizante de agarosa al 2% (agua DEPC). Las muestras fueron preparadas con 10 µL de RNA [500ng], 1 µL red gel y 1 µL de tampón de carga. La mezcla se calentó a 65 °C por 10 minutos para posteriormente colocar en el gel y correr a 100 volts durante 30 minutos.

## ○ Etapa 2 Síntesis de cDNA

Se inició con el alineamiento previo de los primers (pd(N)<sub>6</sub> random hexamer) mezclando 3 µL [7.5 µg] y una concentración de 20 µg de RNA, de 6 a 12 µL, dependiendo la concentración de RNA de cada muestra y aforando a 13.5 µL con agua DEPC. Las condiciones del alineamiento fueron:

70 °C por 10 minutos, 25 °C por 10 minutos y 4°C por tiempo indefinido. Alternativamente se incubó 10 minutos a 70 °C, 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se conservó en hielo. La reacción de extensión del cDNA se realizó bajo las condiciones que se muestran en la tabla 3

*Tabla 3. Reacción de extensión del cDNA*

Reacción	Condiciones
Mezcla de oligos y RNA .....16.5 µL	Incubar 2 horas a 42 °C en un termociclador
RT buffer 5x.....6µL	
DTT 0.1 M.....3 µL	
RNase OUT (40 U/ µL .....1 µL	
SuperScript II RT (200 U/µl) .....2 µL	
50x dNTPs/aa-dUTP mix .....0.6µL	
H <sub>2</sub> O DEPC.....3.9 µL	

Para eliminar el RNA no transcrito en cDNA se realizó hidrolisis alcalina, añadiendo a los 30 µL de la reacción 10 µl de EDTA 50 mM pH 8 y 10 µl de NaOH 1 N, la mezcla fue incubada a 65 °C durante 15 minutos, posteriormente para neutralizar se añadieron 25 µL de HEPES 1 M pH 7.5

La eliminación de primers y dNTPs no incorporados se realizó con el kit “PCR purification QIAGEN”. La concentración de cDNA fue determinada con el espectrofotómetro antes mencionado, el cDNA obtenido se puso a secar por aproximadamente 40 minutos utilizando un speed-vac.

○ Etapa 3 Incorporación de fluoróforos (trabajar en oscuridad)

El cDNA previamente secado fue resuspendido con NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M pH 9.0; agregando los fluoróforos, dejando incorporar por 2 horas a temperatura ambiente y mezclando en intervalos de 30 minutos. Los fluoróforos utilizados fueron “Cy<sup>TM3</sup> monofunctional reactive dye to label” (muestras antes de la desecación) y el “Cy<sup>TM5</sup> monofunctional reactive dye to label” (muestras después de la desecación). Posterior a las 2 horas se agregó hidroxilamina 4M y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente (Quenching). Para realizar la purificación del cDNA marcado se utilizó el mismo kit mencionado en la etapa anterior, eluyendo con 50 µL de tampón fosfato 4 mM, pH 8.5 en microtubos ámbar de 1.5 mL posteriormente se midió la densidad de marcaje en

el espectrofotómetro (pmoles de CyDye/ $\mu$ g de cDNA) por último se mezclaron las parejas Cy5/Cy3 para colocar a secar en el speed-vac (en oscuridad) ( $\approx$  1 hora)

#### ○ Etapa 4 Hibridación

Se inició limpiando los chips de arrays (3 chips por cada condición) con aire comprimido para después sumergirlos en solución de bloqueo (5x SSC; 0.1% SDS; 1% BSA) a 42 °C durante 45 minutos, posteriormente se realizaron 2 lavados con H<sub>2</sub>O milliQ y se escurrieron longitudinalmente en papel entre cada lavado, se realizó un lavado adicional con isopropanol para después centrifugar los chips en tubos falcon de 50 mL. El cDNA marcado con los fluoróforos fue rehidratado con 35  $\mu$ L 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, para seguir con la desnaturalización a 98 °C por 3 minutos, después se centrifugó por 1 minuto para eliminar partículas precipitadas. Las muestras se colocaron longitudinalmente sobre la parte central de un cubre objetos para inmediatamente colocar cada chip (microarreglo) sobre estos. Los chips se colocaron en una cámara de hibridación (ArrayIt Hybridization Cassette), la cámara fue cerrada herméticamente y sumergida en un baño maría a 42 °C durante 20 horas.

#### ○ Etapa 5 Lavados y escaneado (mantener en oscuridad)

Cada microarreglo fue retirado de la cámara de hibridación para realizar 4 lavados; se inició sumergiendo los chips en la solución de lavado 1 (Citrato de sodio salino (SSC) 2X, SDS 0.1%) previamente calentada a 42 °C manteniendo en agitación constante hasta que los cubre objetos se desprendieran, para incubar nuevamente 5 minutos en agitación a la misma temperatura. Cada microarreglo se transfirió a la solución de lavado 2 (SSC 1X) durante 5 minutos en agitación constante a temperatura ambiente (se realizó dos veces); de la misma manera los microarreglos se colocaron en la solución de lavado 3 (SSC 0.2X) bajo las condiciones y repeticiones anteriores; por último, los microarreglos se lavaron con la solución de lavado 4 (SSC 0.1X) por 5 minutos a temperatura ambiente. Para secar los microarreglos se colocaron verticalmente en tubos falcon de 50mL con papel absorbente en la base del tubo y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los microarreglos fueron escaneados uno a uno con el Scanner

Axon 4100 A usando el programa GenePix, escaneando 3 veces por punto ( $\approx 25$  minutos por microarreglo). Los datos obtenidos fueron almacenados en la base de datos AlmaZen, usando los parámetros de normalización Fold change  $< -2$  y  $> 2$ ; Avg signal  $> 64$  y pValue  $< 0.005$ .

#### ○ Etapa 6 Análisis bioinformático de microarreglos

El análisis de las imágenes y los resultados se recabaron en archivos .gps, que posteriormente fueron cargados en la base de datos almaZen (<http://almazen.eez.csic.es:8230/almazen/jsp/login.html>, developed bioalma), para continuar con el análisis de expresión diferencial de genes (DEG) y donde se aplicaron los siguientes criterios de normalización Fold change ( $< -2$ ,  $> 2$ ), Av. Signal ( $> 64$ ,  $> 64$ ) y p-value ( $< -0.05$ ,  $> 0.05$ ).

La información sobre la función de los genes fue analizada con ayuda de “The Pseudomonas Genome Database (<http://www.pseudomonas.com>)”. Adicionalmente se realizó un análisis semántico REVIGO (Reduce Visualize Gene Ontology) para los genes diferencialmente expresados a los 18 DPID con una rehidratación de 24 horas. Se obtuvieron los términos GO de cada gen a través de la base de datos “Pseudomonas Genome Database”, donde se encuentra anotado el genoma de *P. putida* KT2440. La lista de términos GO para función biológica, se introdujo en el software REVIGO (Reduce+ Visualize Gene Ontology, <http://revigo.irb.hr>), usando los parámetros que se encuentran por defecto y seleccionando como base de datos los términos GO de *Pseudomonas aeruginosa*, obteniendo un esquema correspondiente al análisis de enriquecimiento de genes (GSEA).

#### 4. Cambios en la cantidad de DNA de *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación

Células de *P. putida* KT2440, fueron sometidas a desecación durante 18 días realizando extracción de DNA antes de la desecación y 18 días posteriores a la desecación con diferentes tiempos de rehidratación (20 minutos, 24, 48 y 72 horas). La extracción de DNA antes y después de la desecación se realizó con el kit Wizard® Genomic DNA Purification. La concentración del DNA de cada muestra fue estimada con el Thermo Scientific™ NanoDrop 2000, para visualizar la integridad del DNA, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% (30 minutos, 100 volts).

## VII. RESULTADOS

### 1. Viabilidad de *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación

#### 1.1 Supervivencia a la desecación de *P. putida* KT2440 en presencia de “protectores”

Se exploró la tolerancia a desecación de *P. putida* KT2440 en presencia de diversas sustancias que se usaron como posibles protectores (Tabla 4). Las muestras fueron sometidas a desecación durante 18 días; observando que a los 12 DPID la BSR disminuyó a 0 en las muestras donde no se agregó protector; algunos de los compuestos explorados fueron capaces de proteger a esta bacteria de la desecación (Tabla 4); siendo los azúcares no reductores (trehalosa y sucrosa) y el monosacárido glucosa los que mayormente protegieron a *P. putida* KT2440 de la desecación seguidos de la fructosa y algunos polialcoholes (dulcitol, manitol y myo-inositol). Como se muestra en la tabla 4, algunos compuestos fueron menos eficientes para proteger a esta bacteria de la desecación, teniendo incluso una BSR muy similar a la observada cuando no hubo presencia de protectores. Es de notar que los aminoácidos tienen un efecto negativo en la supervivencia bacteriana bajo estrés por desecación en comparación con la ausencia de un protector.

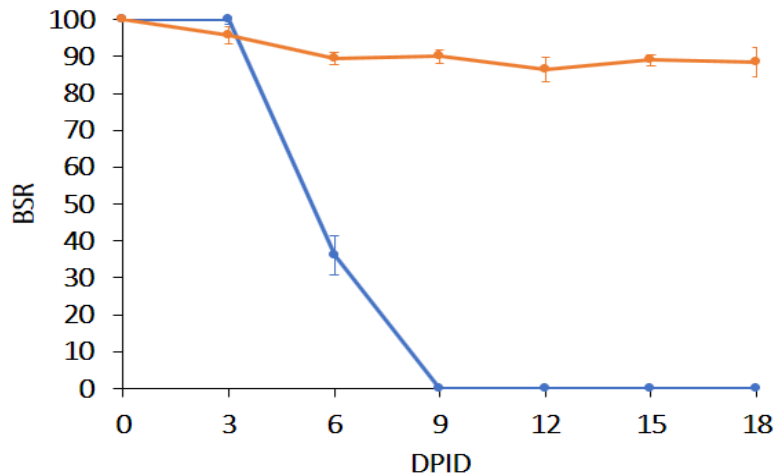
**Tabla 4.** BSR de *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación en presencia o ausencia de sustancias protectoras (200mM)

	0 DPID	3 DPID	6 DPID	9 DPID	12 DPID	15 DPID
<b>TREHALOSA</b>	100	100.79 (± 2.75)	86.66 (± 3.83)	82.89 (± 1.5)	78.65 (± 4.41)	79.56 (± 2.79)
<b>SUCROSA</b>	100	96.67 (±1.88)	88.77 (± 1.11)	75.99 (± 6.61)	77.05 (± 5.10)	79.05 (± 5.10)
<b>GLUCOSA</b>	100	84.78 (± 1.32)	85.62 (± 1.13)	84.36 (± 2.55)	84.13 (± 1.19)	80.84 (± 0.82)
<b>FRUCTOSA</b>	100	74.62 (± 3.92)	73.83 (± 1.51)	73.12 (± 4.74)	71.05 (± 4.59)	65.793 (± 6.05)
<b>DULCITOL</b>	100	97.65 (± 0.58)	80.00 (± 2.35)	68.89 (± 8.08)	63.65 (± 4.31)	55.31 (± 9.01)
<b>MANNITOL</b>	100	97.34 (± 1.15)	80.33 (± 0.69)	68.61 (± 2.61)	53.59 (± 5.54)	50.26 (± 6.98)
<b>MYO-INOSITOL</b>	100	99.57 (± 0.94)	80.76 (± 3.83)	74.92 (± 3.32)	55.70 (± 6.93)	47.56 (± 4.3)
<b>RAFINOSA</b>	100	78.86 (± 8.39)	69.37 (± 4.32)	55.43 (± 1.11)	54.10(± 3.79)	47.54 (± 3.79)
<b>GLUCONATO DE SODIO</b>	100	87.41 (± 4.25)	52.04 (± 4.09)	42.34 (± 5.16)	44.20 (± 5.56)	35.15 (± 5.46)
<b>ARABINOSA</b>	100	58.13 (± 10.51)	26.91 (± 8.91)	36.60 (± 9.40)	17.78 (± 8.40)	20.06 (± 8.86)
<b>MALTOSA</b>	100	92.00 (± 3.25)	14.36 (± 14.37)	20.76 (± 4.82)	15.73 (± 4.81)	9.99 (± 5.33)
<b>XYLOSA</b>	100	70.34 (± 1.65)	62.25 (± 1.66)	53.84 (± 3.99)	43.21 (± 6.35)	17.44 (± 6.10)

<b>LACTOSA</b>	100	49.40 (± 9.95)	30.71 (± 6.98)	30.84 (± 6.42)	16.09 (± 5.71)	10.18 (± 5.04)
<b>ADONITOL</b>	100	99.22 (± 1.45)	73.88 (± 8.09)	12.98 (± 8.02)	16.23 (± 5.04)	4.43 (± 5.91)
<b>AGUA</b>	100	88.42 (± 7.09)	50.16 (± 8.1)	21.47 (± 9.68)	0	0
<b>GALACTOSA</b>	100	7.531 (± 16.84)	5.78 (± 12.92)	12.88 (± 8.9)	0	0
<b>TIROSINA</b>	100	94.58 (± 0.61)	31.74 (± 4.97)	0	0	0
<b>GLICINA</b>	100	89.79 (± 0.96)	16.67 (± 9.49)	0	0	0
<b>PROLINA</b>	100	97.67 (± 2.61)	0	0	0	0
<b>METIONINA</b>	100	88.16 (± 1.56)	0	0	0	0
<b>ORNITINA</b>	100	85.60 (± 2.62)	0	0	0	0
<b>DEIOXILATO DE SODIO</b>	100	80.33 (± 5.04)	0	0	0	0
<b>CISTEINA</b>	100	0	0	0	0	0

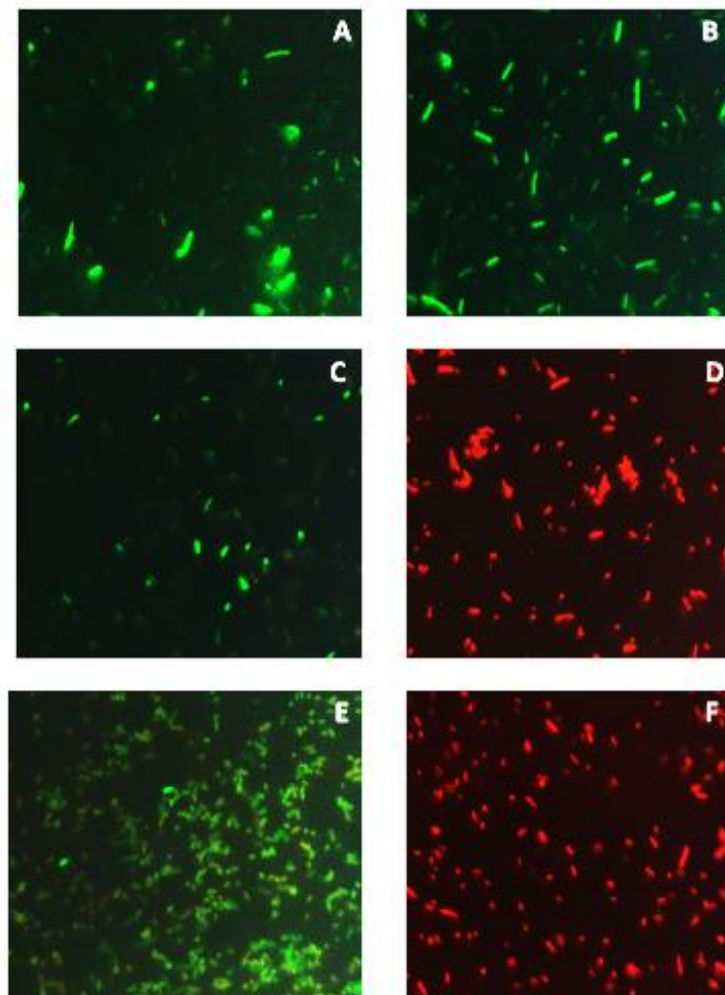
## **1.2 Deseccación de *P. putida* KT2440, adherencia a semillas de maíz y su capacidad para colonizar la rizósfera**

Células lavadas de *P. putida* KT2440 fueron sometidas a desecación durante 18 días en presencia de agua o trehalosa; observando a los 9 DPID la disminución de la BSR a 0 en muestras dónde no fue agregado protector; en presencia de trehalosa el número de bacterias fue alrededor de  $10^8$  UFC/mL durante los 18 días de desecación (Figura 6). En este experimento simultáneamente se evaluó la viabilidad bacteriana antes de la desecación y 18 días posteriores a la desecación utilizando el kit "Live/Dead BacLigth™ Bacterial Viability", observando antes de la desecación, células verdes en ambas condiciones; con y sin trehalosa (Figs. 7A y 7B) y a los 18 DPID, solo las células protegidas se observaron de color verde y las células no protegidas se observaron de color rojo (Fig. 7C y 7D); lo que indica que las células no protegidas han sufrido daño en la membrana y según las especificaciones del fabricante, están muertas.



**Figura 6.** BSR de *P. putida* KT2440 con trehalosa 200mM (línea naranja) y sin protector (línea azul)

Después de 18 DPID, las muestras fueron rehidratadas y se usaron para inocular semillas germinadas de maíz durante 1 hora, observando que el número de bacterias no cambió después de la interacción con las semillas ( $10^8$  UFC/ml en presencia de trehalosa y 0 sin protector). Las semillas inoculadas fueron transferidas a tubos Falcon que contenían 6.4 g de vermiculita estéril. La adherencia de las bacterias se determinó dos horas posteriores a la siembra siendo el número de bacterias de  $9.1 \times 10^6$  UFC/semilla para los tratamientos de trehalosa y 0 para los tratamientos sin protector. La integridad de la membrana se determinó con el kit antes mencionado observando células verdes en el caso donde la desecación ocurrió en presencia de protector y células rojas en donde no hubo presencia de protector (Fig. 7E y 7F).

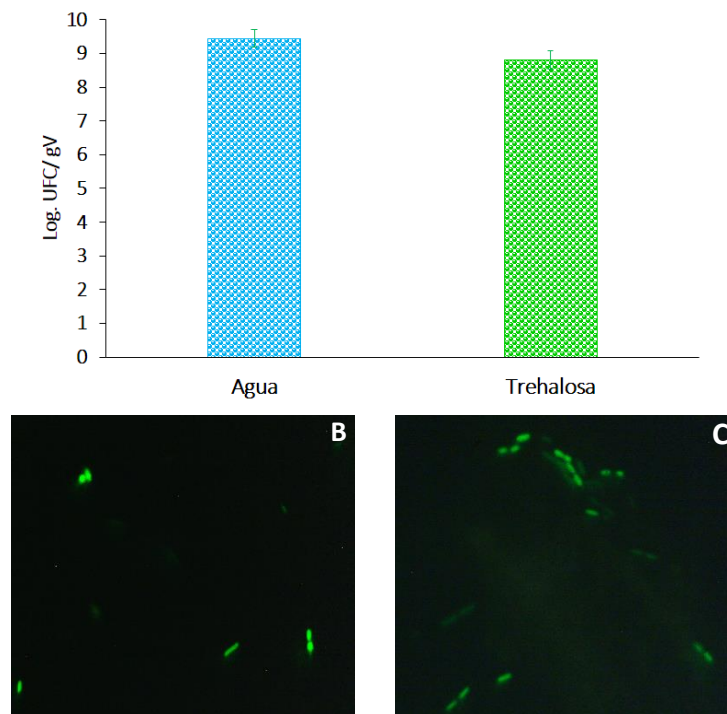


**Figura 7.** Microscopia de fluorescencia de *P. putida* KT2440 usando el kit “Live/Dead BacLigth™ Bacterial Viability”. Células antes de la desecación con y sin protector (A y B); células 18 DPID con 20 minutos de rehidratación con y sin protector (C y D); bacterias adheridas a semillas germinadas de maíz con y sin protector (E y F). Cada imagen representa el MERGE de dos imágenes capturadas (células verdes y rojas)

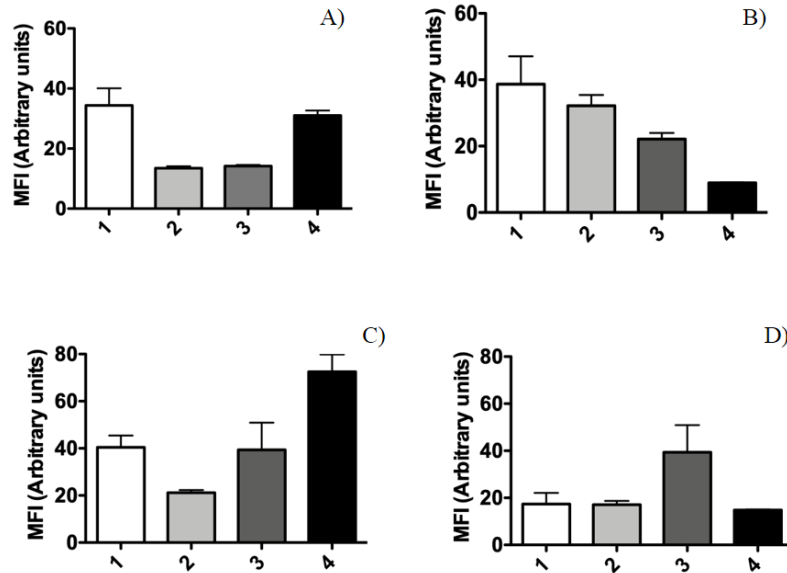
La colonización de *P. putida* KT2440 en la rizósfera de plantas de maíz, se determinó 15 días posteriores a la inoculación (dpi). Sorprendentemente se detectó la presencia de *P. putida* KT2440 en números elevados colonizando la rizosfera de plantas maíz para ambos tratamientos;  $4 \times 10^8$  UFC/gV para el tratamiento con trehalosa y  $9 \times 10^8$  UFC/gV para el tratamiento sin protector (Fig. 8A). La recuperación de células bacterianas en la rizósfera de plantas, derivadas de semillas en las que no se detectaron bacterias después de la desecación, podría sugerir que las bacterias entraron en un estado viable no cultivable durante el proceso de desecación (tratamiento sin el uso de protectores) y fueron capaces de volver al estado cultivable al interactuar con plantas



de maíz. Al realizar la prueba de integridad de membrana en ambos tratamientos solo se observaron bacterias de color verde, sugiriendo que la membrana celular pudo haberse reparado durante la interacción con la planta favoreciendo que las células retornaran al estado cultivable (Fig. 8B y 8C). Los análisis de MFI corroboraron las observaciones en la restauración de la integridad de la membrana, ya que la MFI del SYTO® 9 tuvo un mayor incremento respecto a los valores obtenidos del ioudro de propidio (Fig. 9)



**Figura 8.** Colonización de la rizósfera de maíz de *P. putida* KT2440 en tratamientos con y sin protector (A). Microscopia de fluorescencia de la colonización de la rizósfera de maíz de *P. putida* KT2440 sin protector (B) y con protector (C) usando el kit “Live/Dead BacLight™ Bacterial Viability”. Cada imagen representa el MERGE de dos imágenes capturadas (células verdes y rojas)



**Figura 9.** Intensidad media de fluorescencia (MFI) de muestras desecadas en presencia (trehalosa 200mM) (A y B) y muestras desecadas sin protector (C y D). Muestras antes de la desecación (1), muestras con 18 días de desecación y 20 minutos de rehidratación (2) células adheridas a semillas de maíz (3) células colonizando la rizósfera de maíz (4). (A y C) Análisis de SYTO® 9 y (B y D) análisis del ioduro de propidio

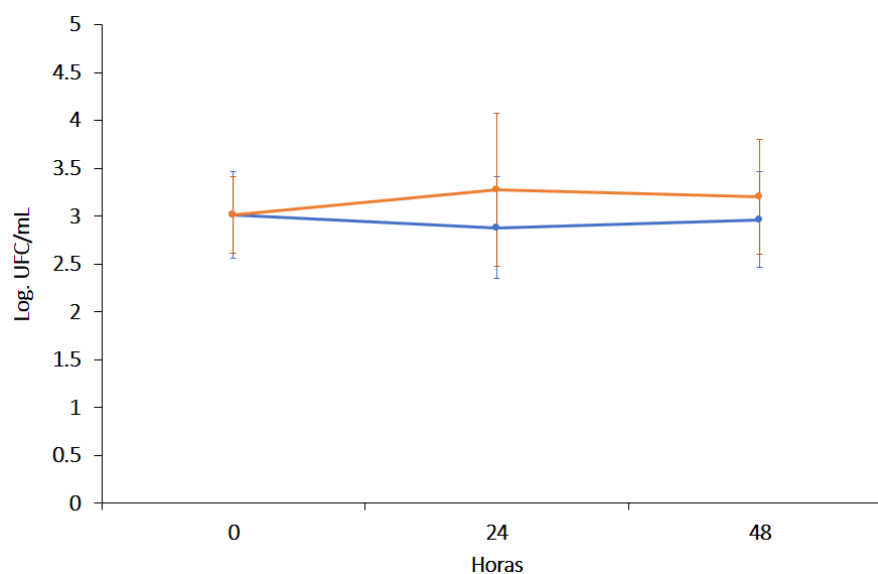
### **1.3 Retorno al estado cultivable de *P. putida* KT2440 después de la rehidratación con exudados rizosfericos de plantas de maíz o bajo rehidratación prolongada**

Para explorar si los exudados rizosfericos de plantas de maíz pueden favorecer el retorno al estado cultivable de células en fase estacionaria se desecaron durante 18 días y fueron rehidratadas con exudados rizosfericos de maíz en distintas etapas de crecimiento de la planta: 1) exudados de semillas de maíz en germinación y 2) exudados rizosfericos de plantas de maíz crecidas durante 12 días; como control se usó agua para rehidratar las muestras. Los tiempos de rehidratación explorados fueron 20 minutos, 1, 3, 6, 9, 12, 24, 27, 30 y 48 horas, determinando en cada tiempo el número de bacterias (Log. UFC/mL). Como se observó anteriormente, después de 18 días de desecación y una rehidratación rápida (20 minutos) no fue detectada la presencia de *P. putida* KT2440 en el medio de cultivo, pero el retorno al estado cultivable ocurrió después de una rehidratación prolongada tanto con agua como con exudados, interesantemente el retorno al estado cultivable ocurrió más rápido en muestras que fueron rehidratadas con exudados (12 horas), observando que aún los exudados obtenidos de semillas de maíz en germinación también fueron capaces de acelerar el retorno al estado cultivable de células de *P. putida* KT2440; en

contraste las muestras rehidratadas con agua retornaron al estado cultivable hasta las 24 horas, teniendo todas las muestras números de bacterias muy similares a las 48 horas de rehidratación (Tabla 5). Durante la rehidratación, las muestras permanecieron estáticas. Experimentos independientes mostraron que las células bacterianas no pueden duplicarse bajo esta condición en presencia de ambos exudados y solo agua (Fig. 10); por lo tanto, la presencia de bacterias de *P. putida* KT2440 después de 18 días de desecación corresponde a células que regresan a un estado cultivable y no al crecimiento activo bajo rehidratación estática. Debido a que las bacterias que regresaron a un estado cultivable alcanzaron niveles de cultivabilidad similares a los observados para las bacterias rehidratadas con los exudados de la raíz de la planta, los experimentos posteriores se llevaron a cabo bajo una rehidratación prolongada con agua.

**Tabla 5.** Número de células de *P. putida* KT2440 (log UFC/mL) después de 18 de desecación y rehidratación con exudados rizosfericos de plantas de maíz

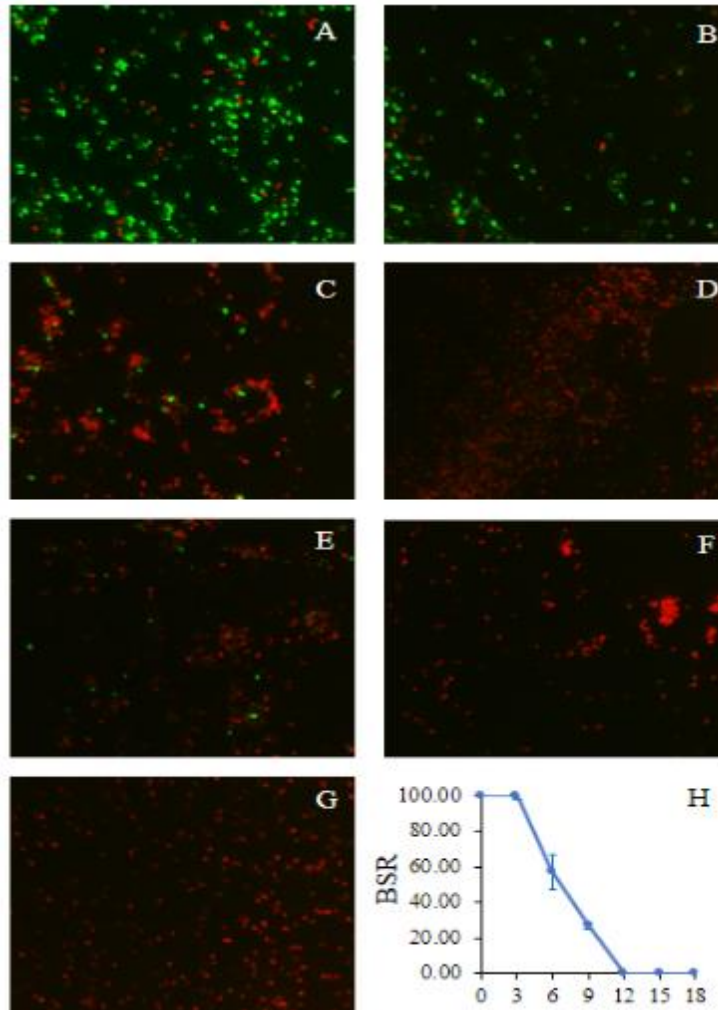
Exudados de maíz	Tiempo de rehidratación								
	20 min	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h	27 h	30 h	48 h
Semillas en germinación	0	0	0	0	3.09 ±0.15	4.81 ±0.19	6.09 ±0.14	6.21 ±0.10	7.11 ±0.19
12 días de crecimiento de plantas	0	0	0	0	3.21 ±0.41	4.78 ±0.26	6.14 ±0.29	6.62 ±0.09	7.32 ±0.23
Agua (control)	0	0	0	0	0	4.34 ±0.16	5.46 ±0.29	5.34 ±0.16	7.39±0.36



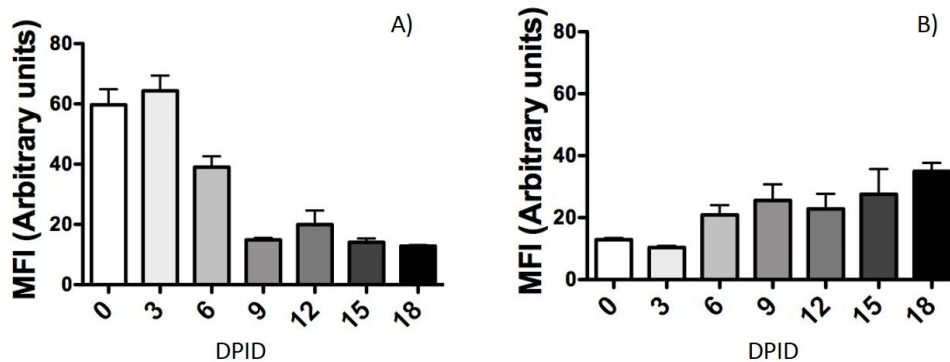
**Figura 10.** Comportamiento de células de *P. putida* KT2440 resuspendidas en agua (línea naranja) y en presencia de exudados de rizosfericos (línea azul), en condiciones estáticas, durante 48 horas.

#### **1.4 Evaluación de la integridad de la membrana plasmática de *P. putida* KT2440 después de un proceso de desecación y rehidratación**

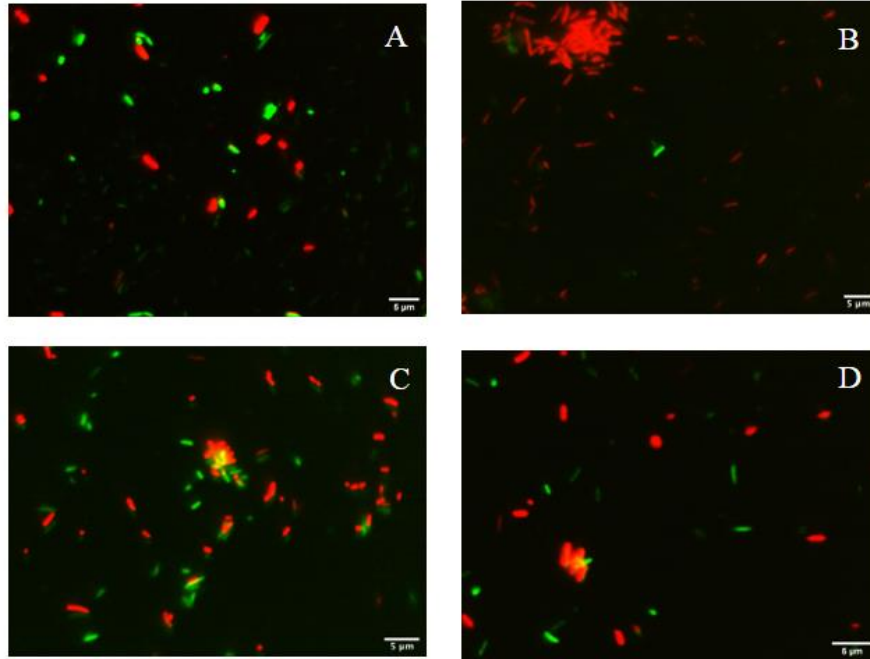
El daño en la membrana plasmática causado por la desecación fue relacionado con la viabilidad y cultivabilidad de *P. putida* KT2440; a células desecadas durante 18 días se les realizó la prueba de integridad de membrana antes y cada tres días posteriores a la desecación con el kit LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability. El número de bacterias antes de la desecación fue de  $4.5 \times 10^8$  UFC/mL (BSR=100) y la mayoría de células se observaron de color verde indicando que las membranas bacterianas se encuentran sanas (Fig. 11A); conforme el tiempo de desecación avanzó la BSR fue disminuyendo hasta ya no detectar crecimiento bacteriano a los 12 DPID (Fig. 11 H) y el número de bacterias verdes fue disminuyendo en proporción al aumento del tiempo de desecación (Fig. 11). Los valores de MFI reforzaron las observaciones, ya que la MFI de SYTO® disminuyó conforme los días de desecación aumentaron y la MFI del yoduro de propidio aumentó (Fig. 12). Estos resultados indican que la membrana plasmática de *P. putida* KT2440 es dañada durante el estrés por desecación y el daño puede estar relacionado con la incapacidad de esta bacteria para crecer en su medio habitual, después de una rehidratación de 20 minutos. A los 18 DPID, muestras fueron rehidratadas durante 24 y 48 horas observando un incremento en el número de bacterias de  $2.3 \times 10^4$  y  $3.2 \times 10^7$  UFC/mL respectivamente, en las pruebas realizadas con el kit LIVE/DEAD se observó un incremento en el número de bacterias lo que sugiere que la membrana plasmática podría estarse reparando (Figura 13). El aumento en la intensidad de SYTO®9 fue apoyado por los valores de MFI (Fig. 14A); curiosamente, los valores de MFI asociados al yoduro de propidio fueron similares durante los tiempos de rehidratación explorados (Fig. 14B).



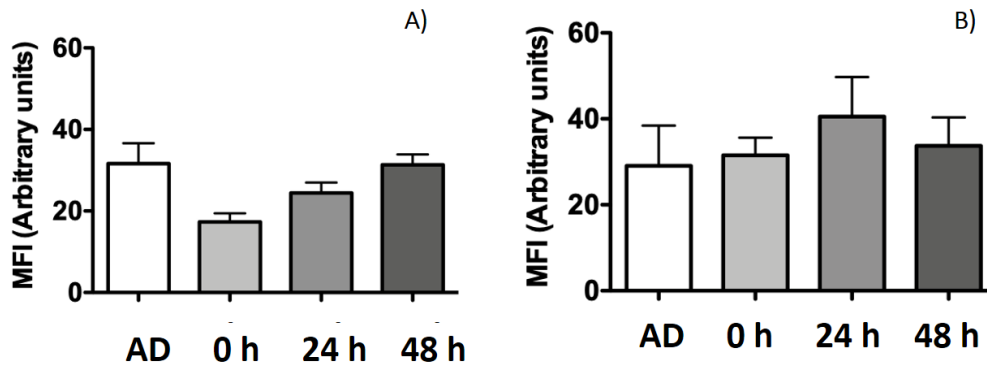
**Figura 11.** Fluorescencia de células de *P. putida* KT2440 desecadas durante 18 días y teñidas con el kit LIVE/DEAD® BacLight™. (A) Células antes de la desecación, (B) 3, (C) 6, (D) 9, (E) 12, (F) 15 y (G) 18 DPID. Cada imagen representa el MERGE de dos imágenes capturadas (células verdes y rojas). BSR de *P. putida* KT2440 durante la desecación



**Figura 12.** MFI de células de *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación. Análisis de SYTO®9 (A): análisis de yoduro de propidio (B)

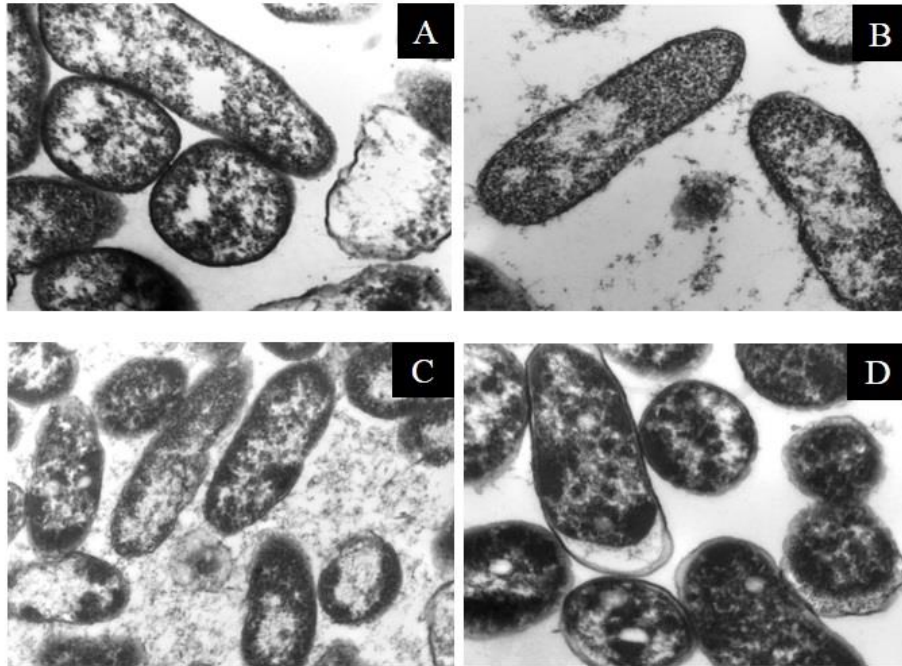


**Figura 13.** Fluorescencia de células de *P. putida* KT2440 desecadas durante 18 días y teñidas con el kit LIVE/DEAD® BacLight™. (A) Células antes de la desecación, (B) células rehidratadas durante 20 minutos y 18 DPID (B); células rehidratadas por 24 horas y 18 DPID (C) células rehidratadas por 48 horas y 18 DPID (D). Cada imagen representa el MERGE de dos imágenes capturadas (células verdes y rojas). BSR de *P. putida* KT2440 durante la desecación



**Figura 14.** MFI de células de *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación durante 18 días y rehidratadas en diferentes tiempos. Análisis de SYTO®9 (A): análisis de yoduro de propidio (B)

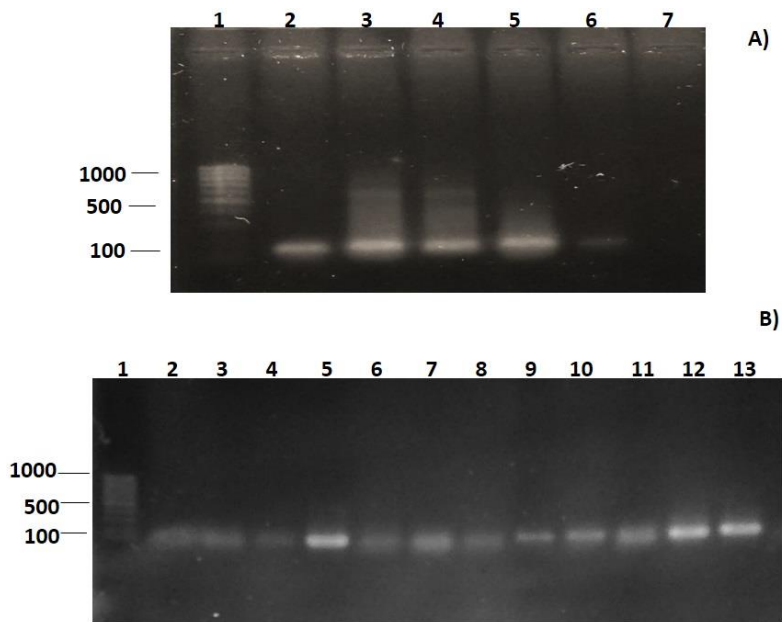
La observación realizada por TEM de células de *P. putida* KT2440 durante la desecación, mostró que las bacterias sufrieron una retracción del citoplasma celular y por consecuencia un aumento del espacio periplásmico (Fig. 15)



**Figura 15.** Microscopía electrónica de transmisión de *P. putida* KT2440. Antes de la desecación 50000x (A), 6 DPID 30000x (B), 12 DPID 30000x (C) y 18 DPID 50000x (D).

### **1.5 Expresión de algunos genes constitutivos de *P. putida* KT2440 antes y después de la desecación.**

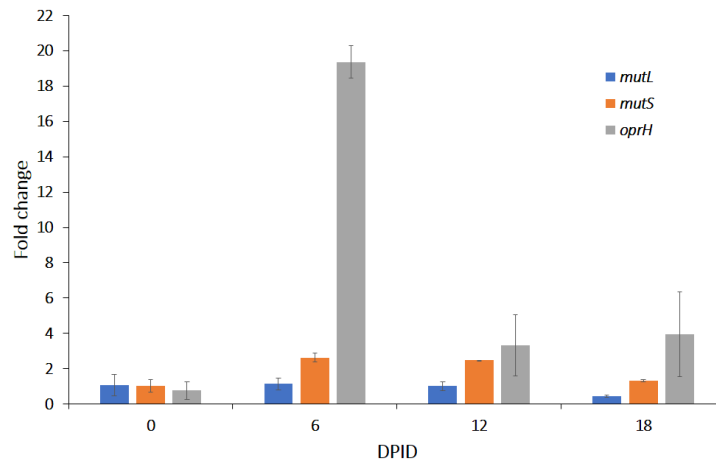
El RNA se extrajo de células no desecadas y desecadas rehidratadas durante 20 minutos, para evaluar la expresión activa de genes de células cultivables y no cultivables. Células desecadas por 18 días y en algunos casos por 40 días, fueron rehidratadas durante 20 minutos y 24 horas. Los genes explorados fueron *rpoN* (housekeeping) *mutL*, *mutS* (proteínas involucradas en el complejo mismatch de reparación de daño a DNA) y *oprH* que codifica una proteína de membrana externa ampliamente distribuida en *P. putida* KT2440. Se observó que todos los genes explorados se expresaron tanto en células no desecadas cultivables como en células desecadas no cultivables, lo que significa que las células desecadas y posteriormente rehidratadas estaban vivas en todos los tiempos de evaluación, a pesar de tener daño en la membrana y no ser cultivables (Fig. 16).



**Figura 16** RT-PCR. **A)** gen 16srRNA. Marcador 1kb (1), células antes de la desecación (2) Células 18 DPID y 20 minutos de rehidratación (3), células 18 DPID y 24 horas de rehidratación (4), células 40 DPID (5) control retrotranscriptasa negativa (6), NTC: templado negativo (7). **B)** Marcador 1kb (1) *mutL* células antes de la desecación (2) *mutL* células 18 DPID y 20 minutos de rehidratación (3), *mutL* células 18 DPID y 24 horas de rehidratación (4), *mutL* células 40 DPID (5), *rpoN* células antes de la desecación (6) *rpoN* células 18 DPID y 20 minutos de rehidratación (7), *rpoN* células 18 DPID y 24 horas de rehidratación (8), *rpoN* células 40 DPID (9), *oprHN* células antes de la desecación (10), *oprH* células 18 DPID y 20 minutos de rehidratación (11), *oprH* células 18 DPID y 24 horas de rehidratación (12), *oprH* células 40 DPID (13).

Se realizó RT-qPCR para medir el nivel de expresión de los genes *mutL*, *mutS* y *oprH* de *P. putida* KT2440 antes de la desecación y a los 6, 12 y 18 DPID. Interesantemente se observó que el nivel de expresión del gen *oprH* se incrementó notablemente (19.37 veces), declinando su expresión a los 12 y 18 DPID sin embargo su expresión fue más alta comparada con células antes de la desecación (Fig. 17). El nivel de expresión del gen *mutS* aumentó más de 2 veces a los 6 y 12 DPID y volviendo a niveles similares de células antes de la desecación. El nivel de expresión del gen *mutL* fue constante, teniendo una disminución en el nivel de expresión a los 18 DPID.





**Figura 17.** Nivel de expresión génica de *mutL*, *mutS* y *oprH* obtenidos por RT-qPCR. Antes de la desecación (0), 6 12 y 18 DPID.

## 2. Análisis del contenido de ácidos grasos de la membrana plasmática en *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación

A células de *P. putida* KT2440 desecadas durante 18 días, con dos tiempos de rehidratación (20 minutos y 24 horas) se les realizó un análisis del contenido de ácidos grasos de la membrana plasmática; mostrando que la cantidad de algunos de los ácidos grasos identificados, aumentó, disminuyó o permaneció sin cambios, en los tiempos explorados (Tabla 6). Por ejemplo el ácido palmítico (C16:0) aumentó considerablemente su concentración después de 18 DPID con una rehidratación de 24 horas. El Cis-10-ácido heptadecenoico (C17:1n-7) presentó un considerable aumento en su concentración después de 18 días de desecación, con ambos tiempos de rehidratación; también se pudo observar que el ácido 9,12-octadecadienoico y el ácido 9-Octadecenoico disminuyeron prominentemente su concentración después de que las células son enfrentadas a estrés por desecación sin importar el tiempo de rehidratación, para comprobar estos resultados es importante repetir el experimento para comprobar los cambios inicialmente observados.

**Tabla 6.** Ácidos grasos identificados en células de *P. putida* KT2440 desecadas por 18 días, con dos tiempos de rehidratación 20 minutos y 24 horas. Sin cambio en la concentración (=), Disminución en la concentración (-), Aumento en la concentración (+)

Ácidos grasos identificados	Concentración µg/ml			
	AD	20 minutos	24 horas	
Ácido hexanoico (metil caproato)	0.55	N.D.	0.55 =	=
Ácido ecanoico (metil decanoato)	0.77	0.76	0.62	-
Ácido decanoico (metil laurato)	0.61	0.61	0.61	=
(Metil cis-9-tetradecenoato)	1.91	1.96	1.81	-
Methyl tetradecanoate (ácido tetradecanoico) C14:0	0.97	1.06	2.82	+
Ácido pentadecanoico (C15:0)	1.46	2.34	3.31	+
Ácido 9-Hexadecenoic, metil ester) C16	36.65	16.2	23.11	- +
Ácid hexadecanoico (ácido palmítico C:16:0)	39.78	37.07	65.77	- +
Cis-10-ácido heptadecenoico (C17:1n-7)	46.85	102.61	196.74	+
Ácido heptadecanoico C17:0	11.78	24.87	3.68	+ -
Ácido linolenico C18:0	9.07	1.74	4.52	-
Ácido 9,12-Octadecadienoico	27.95	7.03	9.44	-
Ácido 9-Octadecenoico	27.48	6.65	8.64	-
Ácido octadecanoico (metil estearato)	2.37	2.41	4.22	+
Ácido araquidonico	2.26	2.24	2.07	= -
cis-11,14-Eicosadienoico	1.69	1.7	1.66	+ -
cis-11-Ácido eicosenico	1.11	1.13	1.11	=
Ácido eicosanoico (metil icosanoato)	0.96	0.96	0.96	=
Ácid heneicosanoico	1.52	1.52	1.53	=
Ácido docosanoico (metil behenato)	1.31	1.3	1.3	=
Ácido Tricosanoico	ND	N.D.	1.86	+
Ácido Tetracosanoico	1.72	N.D.	ND	-

### 3. Identificación de genes involucrados con la resistencia a desecación de *P.*

#### *putida* KT2440

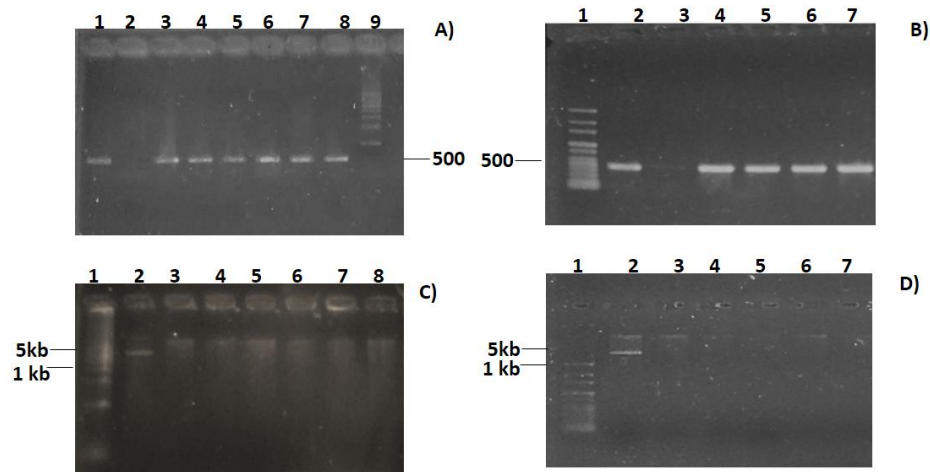
##### 2.1 Mutagénesis al azar en *P. putida* KT2440

Se llevaron a cabo 12 eventos de mutagénesis, realizando una conjugación biparental, siendo *P. putida* KT2440 la cepa receptora y *Escherichia coli* S17 λpir-pUTGm la cepa donadora del plásmido pUTGm; obteniendo 1788 mutantes, con una tasa promedio de mutagénesis de  $1.35 \times 10^{-6}$  y un porcentaje promedio de eficiencia de  $4.564 \times 10^{-6}$ . Adicionalmente con ayuda de un

sofisticado robot picacolonas, se obtuvieron 7680 cepas mutantes de *P. putida* KT2440, generando una banca de 9468 cepas mutantes.

La comprobación de la inserción del cassette de gentamicina se realizó en cepas mutantes de *P. putida* KT2440::miniTn5Gm elegidas al azar, usando *E.coli* S17 $\lambda$ pir-pUTGm (control positivo) y *P. putida* KT2440 (control negativo). El cassette de Gentamicina (536pb) se encontró presente en todas las cepas mutantes y en *E.coli* S17  $\lambda$ pir-pUTGm, no observando ningún producto de amplificación en *P. putida* KT2440 (Fig. 18A y B).

Adicionalmente se corroboró que el plásmido pUTGm solo estuviera presente en *E.coli* S17  $\lambda$ pir-pUTGm y no en las cepas mutantes, comprobando que la resistencia a Gm fue adquirida por la inserción del miniTn5Gm en una región al azar del genoma (Fig. 18 C y D)



**Figura 18.** Amplificación del gen de Gm 1. *E.coli* s17-1, 2. *P. putida* KT2440, 3. pUTGm, 4. M310315-6A, 5. M310315-36A, 6. M280415 -27A, 7. M310315-41A, 8. M310315- 42A, 9 Marcador de peso molecular (A). 1. Marcador, 2. *E. coli* s17-1, 3. *P. putida* KT2440, 4. M30715-75A, 5.M30715-81A, 6. M30715-80A, 7. M30715-58A (B). Presencia del plasmido pUTGM 1. Marcador, 2. *E.coli* s17-1, 3. *P. putida* KT2440, 4. M310315-6A, 5. M310315-36A, 6. M280415 -27A, 7. M310315-41A, 8. M310315- 42A (C). 1. Marcador, 2. *E.coli* s17-1, 3. *P. putida* 4. M310315-6A, 5. M310315-36A, 6. M280415 -27A, 7. M310315-41A.

## **2.2 Experimentos de desecación ambiental de *P. putida* KT2440::miniTn5Gm**

Un total de 1788 mutantes de *P. putida* KT2440::miniTn5Gm fueron sometidas a desecación durante 18 días. Transcurrido este tiempo las células fueron rehidratadas durante 20 minutos, 24 y 48 horas para evaluar su crecimiento en LB Cm<sup>(100)</sup>-Gm<sup>(50)</sup>. Las cepas mutantes seleccionadas fueron las que no retornaron al estado cultivable con el máximo tiempo de rehidratación (48 h) y las que fueron capaces de no perder su cultivabilidad con un tiempo mínimo de rehidratación (20 minutos). Con los experimentos anteriores se seleccionaron 18 cepas de *P. putida* KT2440::miniTn5Gm sensibles a desecación; a las que se les realizó una curva de desecación por

18 días para determinar su BSR cada 3 días (Tabla 7). Es interesante observar que con esta metodología no se observa que las cepas mutantes no retornen al estado cultivable, sin embargo, es importante destacar que 4 cepas mutantes (M310315-6A, M310315-41A, M280415-27A, M210916-120A) no entran completamente al estado VBNC y mantienen una BSR entre 30 y 50 (Tabla 7) y diez cepas mutantes (M30715-80A, M50715-45A, M210916-83A, M150715-19A, M210916-68A, M210916-27A, M210917-67A, M210916-112A y M210916-109A) son más sensibles a la desecación respecto a *P. putida* KT2440, teniendo una BSR de 0 a los 6 y 9 días posteriores a la desecación. Algunas de las cepas mutantes resultaron tener una BSR mayor respecto a la cepa silvestre *P. putida* KT2440 que perdió su cultivabilidad a los 15 DPID, por lo que resulta de gran interés estudiar los genes que se encuentran silenciados en estas cepas para conocer su papel en la tolerancia a desecación y su relación con la entrada al estado viable no cultivable.

**Tabla 7.** BSR de cepas de *P. putida* KT2440::miniTn5Gm durante 18 días de desecación

	AD	3 DPID	6 DPID	9 DPID	12 DPID	15DPID	18 DPID
<i>P. putida</i> KT2440	100	93.09 ± 0.73	82.41 ±1.43	36.49 ±3.28	28.66 ±4.28	0	0
<i>M280415-27A</i>	100	93.08 ±5.15	60.10 ±1.14	47.37 ±3.54	39.09 ±1.61	38.05 ±3.08	28.58 ±2.01
<i>M310315-6A</i>	100	94.17 ± 5.16	65.18 ±4.02	43.19 ±7.08	37.36 ±4.53	35.14 ±2.02	35.45 ±5.08
<i>M310315-41A</i>	100	105.17 ±3.59	66.53 ±2.33	49.36 ±5.07	32.83 ±4.65	31.99 ±3.10	30.24 ±2.60
<i>M310315-42A</i>	100	87.06 ±2.95	58.49 ±4.39	43.13 ±3.10	12.92 ±6.17	19.31 ±0.94	0
<i>M310315-36A</i>	100	86.40 ±5.16	67.88 ±1.66	41.74 ±6.43	26.77 ±5.70	25.47 ±3.93	0
<i>M30715-58A</i>	100	96.94 ±4.13	45.16 ±3.18	0	0	0	0
<i>M30715-81A</i>	100	98.84 ±1.14	49.48 ±4.86	0	0	0	0
<i>M30715-75A</i>	100	93.67±3.59	39.68 ±2.35	0	0	0	0
<i>M30715-80A</i>	100	92.62 ±2.76	0.00	0	0	0	0
<i>M150715-45A</i>	100	100 ±2.80	58.79 ±8.70	0	0	0	0
<i>M210616-83A</i>	100	94.70 ±4.40	49.50 ±5.70	0	0	0	0
<i>M150715-19A</i>	100	100 ±3.80	59.17 ±6.90	0	0	0	0
<i>M210916-68A</i>	100	87.40 ±3.60	38.51 ±5.90	0	0	0	0

210916-120A	100	99.63 ±0.69	56.45 ±4.50	43.84 ±0.62	38.60 ±5.31	0	0
210916-27A	100	92.38 ±2.59	32.47 ±4.25	33.23 ±3.48	0	0	0
21091667A	100	95.92 ±1.78	53.46 ±10.08	37.84 ±3.31	0	0	0
210916-112A	100	95.59 ±3.49	35.39 ±5.31	0	0	0	0
210916-109A	100	95.75 ±2.14	46.74 ±5.53	0	0	0	0

Al resto de cepas mutantes (7680) se les realizó una primera prueba de tolerancia a estrés, mediante liofilización (deseccación rápida). Las muestras perdieron toda el agua en aproximadamente 48 horas. La selección de mutantes se realizó siguiendo el criterio antes descrito teniendo como máximo tiempo de rehidratación 24 h. Las cepas seleccionadas mediante el ensayo de liofilización fueron sometidas a un segundo análisis de desecación ambiental en placas multipozos durante 12 días con 2 tiempos de rehidratación (20 minutos y 24 horas), tomando el mismo criterio de selección antes mencionado. Las condiciones de desecación fueron 30°C y 45% de humedad relativa. Con este ensayo se obtuvieron 220 cepas mutantes resistentes y 42 cepas sensibles, de este grupo de mutantes se seleccionaron 4 cepas que tuvieron una densidad óptica por debajo de 0.5 y fueron capaces de sobrevivir 18 días en desecación, para realizar una curva de supervivencia a la desecación durante 18 días, determinando cada 3 días la BSR (Tabla 8). Interesantemente se observó que tres cepas resultaron tener una supervivencia mayor respecto a la cepa silvestre *P. putida* KT2440, por lo que como se mencionó anteriormente es de gran interés seguir el estudio de los genes que se encuentran mutagenizados para poder comprender su papel en la pérdida de viabilidad de esta bacteria

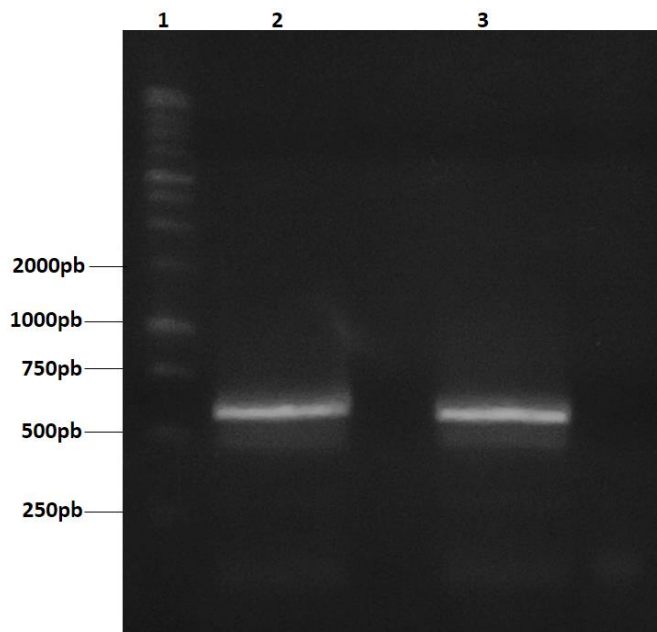
**Tabla 8.** BSR de cepas de *P. putida* KT2440::miniTn5Gm durante 18 días de desecación, con una selección previa por liofilización

	A.D	3 DPID	6 DPID	9 DPID	12 DPID	15 DPID	18 DPID
<i>P. PUTIDA</i> KT2440	100	97.40 ±1.60	69.06 ±2.98	52.65 ±2.59	37.65 ±2.81	0	0
14-75A1	100	86.41 ±2.38	59.24 ±2.26	43.57 ±3.54	44.11 ±2.81	0	0
55-76E2	100	97 ±0.83	90.96 ±1.77	73.01 ±2.84	66.45 ±5.38	40.63 ±1.80	49.21 ±5.52
65-76G11	100	93.72 ±2.63	63.10 ±7.65	46.81 ±4.88	47.89 ±7.20	31.92 ±3.36	34.42 ±3.64

<b>134-53D10</b>	100	95.46 ±2.17	52.36 ±2.82	46.82 ±3.24	44.56 ±4.06	35.48 ±2.16	33.97 ±3.59
------------------	-----	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------

**2.3 Secuenciación de genes mutagenizados en cepas de *P. putida* KT2440::miniTn5Gm sensibles a desecación.**

Los genes de las cepas mutantes resistentes y sensibles a la desecación se determinaron por la técnica de PCR arbitrarias. La banda más representativa observada en el gel de electroforesis, fue cortada, purificada y enviada a secuenciar (Fig. 19); logrando identificar 6 genes de cepas de *P. putida* KT2440::miniTn5Gm (Tabla 9), en la cual sólo la mutante 14-75A1 resultó ser ligeramente más sensible a la desecación ya que pierde su cultivabilidad a los 15 DPID, interesantemente a este gen aún no se le ha asignado una función comprobada, sin embargo es probable tenga un papel importante en la entrada y salida del estado viable no cultivable. Es importante mencionar que los genes que se identificaron en las cepas mutantes 14-75A1, 55-76E2, 65-76G11, 134-53D10 tuvieron un porcentaje de identidad menor del 95% por lo que deberán secuenciarse nuevamente para poder asegurar que en ese gen se encuentra inserto el miniTn5.



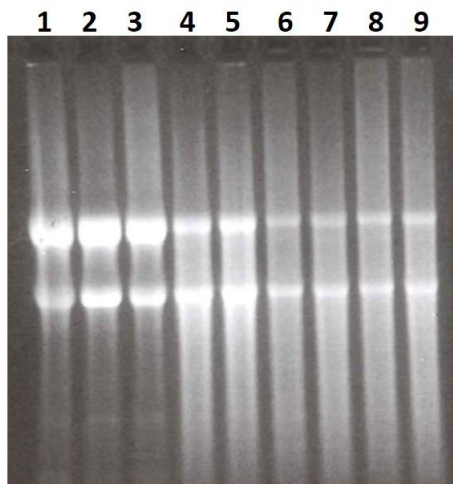
**Figura 19.** Amplificación del producto de PCR arbitraria. Marcador de peso molecular (1), cepa M180415-27A (2) cepa M310315-6A (3).

**Tabla 9.** Genes de *P. putida* KT2440::miniTn5Gm, identificados usando la técnica de PCRs arbitrarias

Mutante	Condición	Gen	Identidad	Producto	Función
<b>M280415-27A</b>	Resistente a desecación	<i>murC</i>	99%	UDP-N-acetylmuramate-L-alanine ligase	Actividad ligasa en la síntesis de Peptidoglicano
<b>M310315-6A</b>	Resistente a desecación	<i>PP_2106</i>	98%	Transportador de amonio	Transportador de amonio, parte estructural de la membrana
<b>14-75A1</b>	Sensible a desecación	<i>PP_2708</i>	81%	Proteína conservada de función desconocida	Posible función de hemolisina termoestable
<b>55-76E2</b>	Resistente a desecación	<i>oprD</i>	74%	Porina OprD	Componente integral de membrana, actividad porina, movimiento de macromoléculas, pequeñas moléculas y iones
<b>65-76G11</b>	Resistente a desecación	<i>PP_2107</i>	81%	Proteína hipotética (Glutaredoxina-2)	Posible función como portador de electrones en la síntesis dependiente de glutatión
<b>134-53D10</b>	Resistente a desecación	<i>PP_4252</i>	79%	Citocromo c oxidasa tipo cbb3	Proteína transmembranal, cataliza la reducción de O <sub>2</sub> y simultáneamente bombea protones a través de la membrana. función especializada en el metabolismo energético

## **2.4 Análisis transcriptómico de *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación**

Para determinar cambios en la expresión genética de *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación, se realizó un análisis por microarreglos, comparando la expresión de genes de células antes de la desecación y células desecadas por 18 días con dos tiempos de rehidratación, 20 minutos y 24 horas. La integridad del RNA que se usó para llevar a cabo el análisis fue verificada mediante electroforesis en gel desnaturizante de agarosa (Fig. 20). La concentración promedio de RNA obtenido después del tratamiento con el kit de limpieza de DNA (mencionado en materiales y métodos) fue de 3.5 µg/mL para células antes de la desecación, 2.3 µg/mL en células con 18 DPID y 20 minutos de rehidratación y de 2.42 µg/mL con 18 DPID y 24 horas de rehidratación



**Figura 20.** Electroforesis de RNA usado para el análisis de microarreglos después de tratamiento con DNAsa. Antes de la desecación (1, 2 y 3), 18 DPID y 20 minutos de rehidratación (4, 5 y 6), 18 DPID y 24 horas de rehidratación (7, 8 y 9)

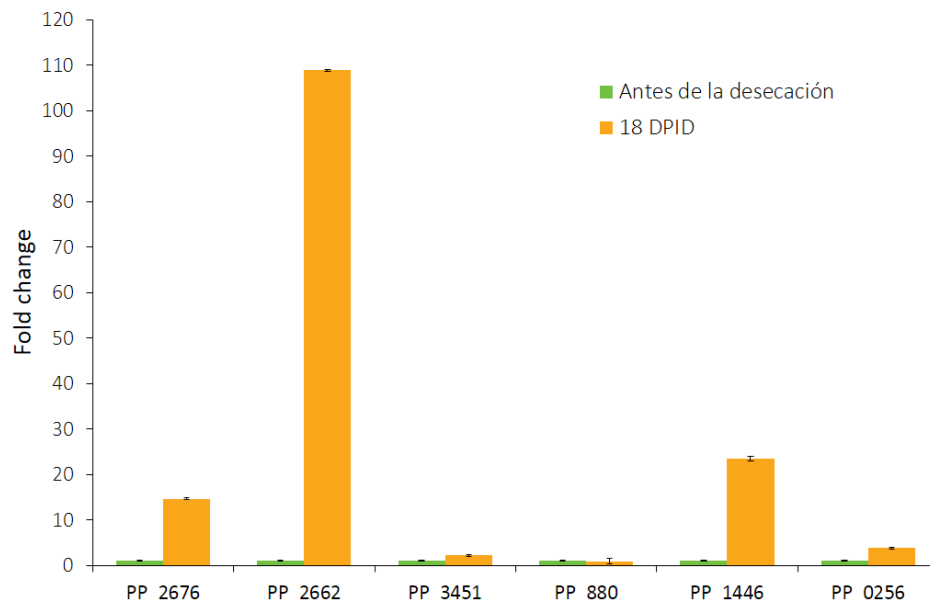
El análisis realizado, indicó la sobreexpresión de 6 genes de *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación durante 18 DPID con una rehidratación de 20 minutos (Tabla 10). Teniendo los genes PP\_3451 y PP\_2676 un fold change por encima del 2 y los genes PP\_0880, PP\_1446, PP\_0256 y PP\_2662 superior a 3, por lo que se sugiere podrían tener un papel importante en la entrada al estado viable no cultivable de *P. putida* KT2440. Para comprobar la sobreexpresión observada en el análisis de microarreglos, se realizó una RT-qPCR a los 6 genes identificados (Fig. 21). Observando que uno de los genes con mayor sobreexpresión fue el gen PP\_2662 que se expresó 108 veces más a los 18 DPID con una rehidratación corta respecto a la expresión detectada antes del estrés, resulta de gran relevancia seguir investigando el papel que podría estar desempeñando en la desecación ya que su función es desconocida. En el caso de los genes PP\_1446 y PP\_2676 también se observó una mayor sobreexpresión, 23 y 14 veces más respectivamente; los genes PP\_0256 y PP\_3451 tuvieron una sobreexpresión de 3 y 2 veces más respectivamente, a los 18 DPID y rehidratación corta; el gen PP\_0880 no mostró una sobreexpresión después de la desecación.

**Tabla 10.** Genes de *P. putida* KT2440 sobre-expresados 18 días posteriores a la desecación con una rehidratación rápida (20 minutos)

Gen	Fold change	Proteína
PP_3451	<b>2.31</b>	Proteína conservada
PP_2676	<b>2.354</b>	Proteína putativa de unión en el periplasma
PP_0880	<b>3.585</b>	dipeptido-dppC- Transportador ABC permeasa



PP_1446 <i>tonB</i>	<b>3.888</b>	Receptor dependiente de TonB
PP_0256	<b>3.893</b>	Molibdopterina oxidoreductasa
PP_2662	<b>3.893</b>	Proteína conservada



**Figura 21.** Comprobación de la sobreexpresión de genes identificados en el análisis de microarreglos. La expresión se muestra en células antes de la desecación y 18 DPID con 20 minutos de rehidratación.

En el caso de células con 18 DPID y 24 horas de rehidratación, se identificaron 112 genes sobreexpresados y 39 genes reprimidos. La redundancia de los términos GO con respecto a la función biológica se muestran en un diagrama de dispersión en un espacio bidimensional que agrupa similitudes semánticas de los términos GO, el color de la burbuja indica el valor del Log Fold Change, sobreexpresados (escala amarillo-rojo) y reprimidos (escala amarillo-azul); mientras que el tamaño de la burbuja indica la frecuencia del término GO. Algunos de los genes sobreexpresados se encuentran relacionados con organización de la pared celular, metabolismo de carbohidratos, sistema de transducción de señales de fosforo, metabolismo, biosíntesis, metabolismo de peptidoglicano y proteínas de secreción. Dentro de los genes reprimidos algunos se encuentran relacionados con respuesta a estrés, catabolismo del peptidoglicano, biosíntesis de ácidos grasos, procesos de oxido-reducción, regulación de la trascricpción de DNA, motilidad celular dependiente del flagelo (Fig. 22). Con este análisis se propone que el retorno a la

cultivabilidad de *P. putida* KT2440 implica un complejo sistema de respuesta que le permite usar al estado VBNC como una estrategia para enfrentar la desecación.

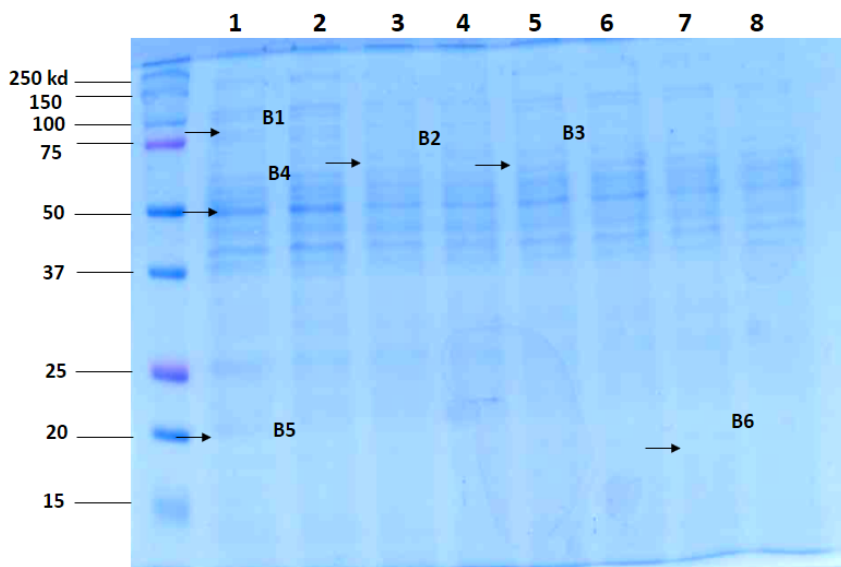


**Figura 22.** Análisis de REWIGO de los genes reprimidos y sobreexpresados de *P. putida* KT2440 después de 18 días de desecación con 24 horas de rehidratación. Los círculos con color cercano al azul representan los genes reprimidos, los círculos de color cercano al rojo representan a los genes sobreexpresados

### 3.4 Identificación de proteínas de *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación

A células de *P. putida* KT2440 en desecación durante 18 días, se les realizó extracción de proteínas totales en dos momentos de rehidratación (20 minutos y 24 horas) y células que no tuvieron rehidratación previa. La cantidad total de proteínas obtenidas se contabilizó y se realizó una electroforesis en gel SDS-PAGE, para observar cambios en la presencia de proteínas antes y después de la desecación; las bandas en donde se observó alguna diferencia fueron cortadas y enviadas a secuenciar (Fig.23). Las proteínas identificadas se muestran en la Tabla 11. Una de las proteínas que se identificó en todos los tiempos explorados fue TufB la cual funciona como un factor de elongación en la síntesis de proteínas; las proteínas identificadas a los 18 días de desecación con 20 minutos de rehidratación fue GroEL que evita pliegues erróneos durante condiciones de estrés y la proteína IpdG que se encuentra relacionada con procesos de óxido

reducción. La banda correspondiente a muestras con 24 horas de rehidratación no logró ser identificadas.



**Figura 23.** SDS-PAGE de *P. putida* KT2440 durante 18 días de desecación. 1 y 2 Antes de la desecación (1 y 2); sin rehidratación (3 y 4); 20 minutos rehidratación (5 y 6); 24 horas rehidratación (7 y 8)

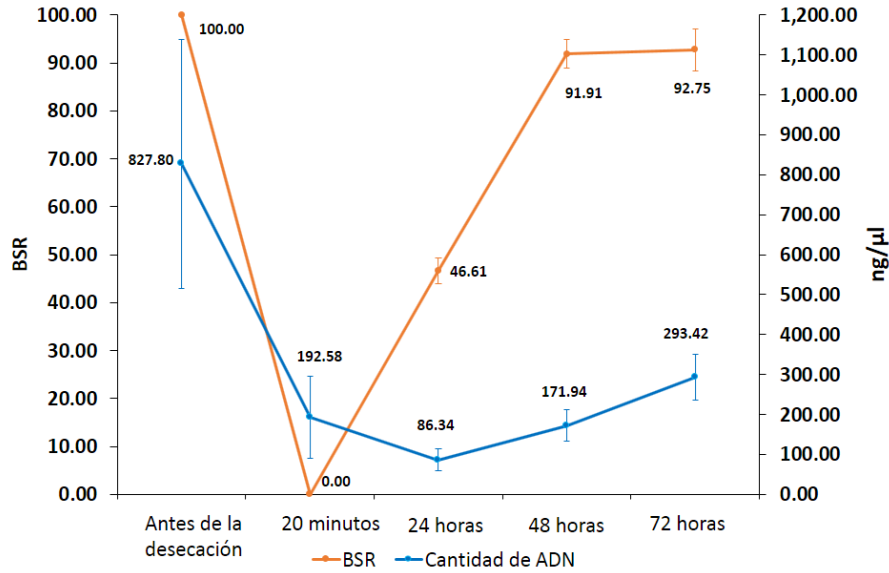
*Tabla 11. Proteínas de P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación.

NO. DE BANDA	CONDICIÓN	BSR	PROTEÍNA	FUNCIÓN
B1	Antes de la desecación	100	<b>TufB</b>	Factor de elongación Tu-B, promueve la unión aminoacil-tARN dependiente de GTP al sitio A de ribosomas durante la biosíntesis de proteínas.
B4			<b>ArcA</b>	Arginina deaminasa. Involucrada en las vías que dan lugar a la descomposición de arginina, papel de hidrolasa actuando sobre enlaces en amidinas lineales. Cataliza la reacción: L-arginine + H <sub>2</sub> O = L-citrulline + NH <sub>3</sub> .
B5			<b>50S; Ctc</b>	Proteína ribosomal 50S, parte estructural del ribosoma, interacciona con el rARN 5S. Proteína de estrés
B2	18 dpd sin rehidratación	0	<b>TufB</b>	Factor de elongación Tu-B, promueve la unión aminoacil-tARN dependiente de GTP al sitio A de ribosomas durante la biosíntesis de proteínas.
B3	18 dpd, 20 min. rehidratación	0	<b>Chaperonina GroEL</b>	Previene el plegamiento erróneo y promueve el repliegue y ensamble adecuado de polipéptidos desplegados generados bajo condiciones de estrés.
			<b>TufB</b>	Factor de elongación Tuf-B, promueve la unión aminoacil-tARN dependiente de GTP al sitio A de ribosomas durante la biosíntesis de proteínas.

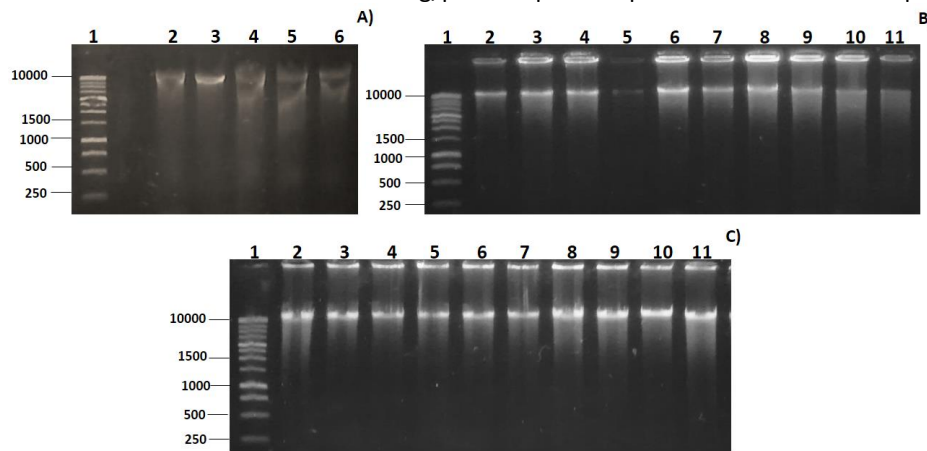
			<b>lpdG; dihidrolipoil dehidrogenasa</b>	Procesos de oxido-reducción, Metabolismo de Glucosa y fructosa
B6	18 dpd 24h rehidratación	<b>62.63</b>	NI	No identificada

#### 4 Cambios en la cantidad de DNA de *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación

A células desecadas de *P. putida* KT2440 (18 días) se les realizó extracción de DNA antes y después de la desecación con cuatro tiempos de rehidratación, 20 minutos, 24, 48 y 72 horas. Los resultados obtenidos muestran que la cantidad de DNA disminuye después del estrés por desecación (18 DPID y 20 minutos de rehidratación) y esta cantidad aumenta en relación al tiempo de rehidratación (Fig. 24), sin embargo, con el tiempo máximo de rehidratación (72 horas) el incremento en la cantidad de DNA no alcanza valores similares a los de células antes de la desecación aun cuando la BSR es de 92.75. Al realizar el análisis estadístico *t*-student, la cantidad de DNA después de la desecación con 20 minutos de rehidratación no muestra una diferencia significativa al compararla con la cantidad de DNA de células con 24 horas de rehidratación. Las imágenes de electroforesis muestran diferencias en las intensidades de las bandas de DNA de células antes y después de la desecación, teniendo mayor intensidad las bandas correspondientes a muestras antes de la desecación y 18 DPID con 72 horas de rehidratación (Fig. 25). Respecto a la tasa de supervivencia bacteriana, esta disminuyó hasta 0 a los 18 DPID con 20 minutos de rehidratación y aumentó en relación al tiempo de rehidratación, teniendo a las 72 horas de rehidratación una BSR de 92.7, lo que equivale a  $9.1 \times 10^7$  UFC. (Fig. 24)



**Figura 24.** Cantidad de ADN y BSR de *P. putida* KT2440 antes de la desecación y 18 DPID con diferentes tiempos de rehidratación. La cantidad de ADN está dada en ng/μl. Cada punto representa la media de 5 repeticiones



**Figura 25.** Electroforesis de DNA de *P. putida* KT2440. (A) Antes de la desecación. Marcador de peso molecular (1), Muestras de DNA (2-6). (B) 18 DPID, Marcador de peso molecular (1), DNA rehidratación de 20 minutos (2-6), DNA rehidratación de 24 horas (7-11). (C) 18 DPID, 1 Marcador de peso molecular, DNA rehidratación de 48 h (2-6), DNA rehidratación de 72 h (7-11).

## VIII. DISCUSIÓN

### 1. Viabilidad de *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación

*P. putida* KT2440 tiene un alto potencial agro-biotecnológico (Matilla *et al.*, 2010; Molina-Romero *et al.*, 2017; Matilla and Krell, 2018) que puede ser aprovechado. De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, esta bacteria es altamente sensible a la desecación propiciando que su potencial no pueda ser aprovechado debido a los fenómenos de desecación que ocurren en el ambiente (Streeter, 2003; Pazos-rojas *et al.*, 2018). La tolerancia a la desecación en bacterias es un factor clave para el desarrollo de inoculantes bacterianos estables, ya que las bacterias tolerantes serán capaces de adherirse a las semillas, tolerar la desecación en el suelo y serán capaces de poder colonizar las raíces de plantas después de un proceso de rehidratación, que propicie condiciones ambientales favorables manteniendo su capacidad para mejorar el crecimiento de las plantas a las que se encuentren asociadas (Molina-Romero *et al.*, 2017; Pazos-rojas *et al.*, 2018). Resulta de gran interés estudiar las estrategias de *P. putida* KT2440 para tolerar la desecación y poder aprovechar sus capacidades benéficas en los campos de cultivo. Se ha reportado que los disacáridos funcionan como buenos protectores de *P. putida* KT2440 bajo estrés por liofilización (Manzanera *et al.*, 2002; Muñoz-Rojas *et al.*, 2006), sin embargo, en esta investigación, sólo los disacáridos fueron capaces de proteger eficazmente a *P. putida* KT2440 de la desecación, siendo el mejor protector la trehalosa, ya que las células fueron capaces de mantener una elevada cultivabilidad. En una investigación se demostró que modificaciones genéticas en *P. putida* KT2440 para sobre producir trehalosa intracelular, no fue capaz de proteger a las células de efectos adversos provocados por la liofilización (Manzanera *et al.*, 2002); en cambio en este trabajo se demostró que cuando este disacárido es añadido a una concentración de 200 mM puede proteger a *P. putida* KT2440 de la desecación.

La desecación de *P. putida* KT2440 en presencia de trehalosa le permitió mantener un elevado número de bacterias hasta los 18 DPID; a diferencia de la desecación sin la presencia de algún protector, en donde el número de células fue indetectable a los 12 DPID, por esta razón se esperaba que sólo las células desecadas en presencia de trehalosa tuvieran la capacidad de adherirse a semillas germinadas y colonizar la rizósfera de plantas de maíz. En los ensayos de

adhesión sólo se detectó la presencia de bacterias de *P. putida* KT2440 desecadas con protector; sorprendentemente el número de bacterias que colonizaron la rizósfera de maíz fue elevado para ambos tratamientos, células desecadas con protección y sin protección. Con estos resultados en el presente trabajo se propone que *P. putida* KT2440 entra a un estado viable no cultivable como una estrategia para enfrentar la desecación y las células son capaces de retornar al estado cultivable después de interactuar con las raíces de plantas, probablemente debido a que los exudados rizosfericos estén activando mecanismos relacionados al retorno. Para determinar si los exudados permiten a *P. putida* KT2440 regresar al estado cultivable, se sometió a desecación durante 18 días, para posteriormente rehidratar con agua o con exudados rizosfericos de plantas de maíz; determinando que el retorno al estado cultivable fue más rápido en la rehidratación con exudados que la rehidratación con sólo agua, lo que sugiere que algunos compuestos o moléculas de los exudados favorecen el retorno al estado cultivable. En estudios con células de *Bacillus atrophaeus* UCMB-5137 creciendo en presencia de exudados de maíz, se observó una mayor expresión de genes relacionados con estrés y desintoxicación (Mwita *et al.*, 2016); es probable que los exudados rizosfericos de plantas de maíz favorezcan la expresión de genes necesarios para un rápido retorno al estado cultivable de *P. putida* KT2440 después de la rehidratación. Entre los compuestos que se encuentran en exudados de plantas de maíz, se ha reportado la presencia de compuestos nitrogenados, ácidos grasos, ácidos orgánicos, azúcares, compuestos volátiles, esteroides, terpenoides y otras sustancias (Walker *et al.*, 2003; da Silva Lima *et al.*, 2014). Será interesante realizar ensayos futuros para probar los compuestos que favorecen el retorno al estado cultivable de *P. putida* KT2440 después de la desecación. El retorno al estado cultivable ocurre cuando las bacterias encuentran condiciones favorables y el estrés es retirado (Stokell and Steck, 2012) esto probablemente explica por qué en este trabajo células no cultivables pudieron regresar al estado cultivable después de una rehidratación prolongada sólo con agua.

Bacterias en estado viable no cultivable pueden ser identificadas mediante técnicas que determinan actividad metabólica aun cuando no son cultivables, como el kit LIVE/DEAD® BacLight™ que identifica daño en la membrana plasmática (Vriezen *et al.*, 2012) y estudios de expresión génica usando RT-PCR y RT-qPCR (Liu *et al.*, 2010; Oliver, 2010).

En el presente trabajo se utilizaron las dos técnicas para determinar la viabilidad en *P. putida* KT2440 en estado VBNC durante la desecación. Con el kit LIVE/DEAD® BacLight™ se observó un aumento en el número de bacterias rojas y en los valores de MFI del yoduro de propidio respecto a la MFI del SYTO®9, lo que indica que el daño en la membrana aumenta en relación al tiempo de desecación. Se sabe que durante la desecación, la membrana plasmática de bacterias sufre un cambio en la composición de ácidos grasos experimentando alteraciones en la fluidez (Scherber *et al.*, 2009), estos cambios podrían permitir que el yoduro de propidio atravesara la membrana y permitiera su unión al DNA generando una tinción roja. De acuerdo a las instrucciones del kit LIVE/DEAD y otros trabajos, las células rojas se consideran muertas (Vriezen and de Bruijn, 2015) a pesar de ello, los resultados obtenidos mostraron que células rojas de *P. putida* KT2440 con 18 días de desecación y rehidratación rápida fueron no cultivables siendo capaces de regresar al estado cultivable después de una rehidratación prolongada o con exudados rizosféricos de maíz, lo que indica que las células rojas no estaban muertas.

Interesantemente, durante la rehidratación prolongada (24 h y 48 h), valores de MFI mostraron que la intensidad del yoduro de propidio disminuyó y aumentaron los valores de MFI del SYTO®9, observando nuevamente la presencia de bacterias verdes; estos datos indican que el yoduro de propidio ya no penetró en algunas de las células rehidratadas, probablemente porque ocurrió una recuperación de la integridad de la membrana, de hecho después de la colonización en plantas de maíz solo se observaron solo células verdes, indicando que la interacción planta-bacteria permite una recuperación total de la membrana plasmática. No obstante, la presencia de células rojas teñidas por el yoduro de propidio, no significa que las células estén muertas; un estudio realizado con células viables de *P. putida* (ATCC 12633) mostraron tinción por el yoduro de propidio, sugiriendo que el uso del kit LIVE/DEAD puede generar un resultado confuso para determinar viabilidad celular (Ivanova *et al.*, 2010). Se propone que se requieren estudios adicionales como TEM, cambios en el potencial y fluidez de la membrana para aclarar el nivel de daño que ocurre en la membrana plasmática de células bacterianas viables no cultivables sometidas a un proceso de desecación-rehidratación.

En la determinación de ácidos grasos de *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación, se observó que algunos de los ácidos grasos explorados aumentan considerablemente su



concentración (ácido palmítico (C16:0) y el Cis-10-ácido heptadecenoico, C17:1n-7); existen reportes previos en donde se determinó un aumento en el porcentaje del C17 ciclopropano cuando *P. putida* KT2440 es sometida a estrés por liofilización, sugiriendo un papel de este ácido graso para estabilizar los lípidos de la membrana y evitar su degradación, además se propone que los ácidos grasos están involucrados en la tolerancia a estrés (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006). Es probable que los ácidos grasos que están aumentando desempeñen un papel importante en evitar la pérdida de la integridad de la membrana plasmática bajo estrés por desecación.

Herramientas moleculares como RT-PCR y RT-qPCR han sido ampliamente usadas para determinar viabilidad celular debido a que el tiempo promedio de vida del mRNA es de aproximadamente 3 a 5 minutos; por lo tanto, se propone que productos amplificados de RNA provienen de una transcripción activa y reciente, funcionando como un excelente indicador de viabilidad celular en bacterias en estado VBNC (Conway and Schoolnik, 2003; Buck and Oliver, 2010). Para comprobar la viabilidad de células rehidratadas no cultivables de *P. putida* KT2440, se analizó la expresión de genes housekeeping (*rpoN* y 16S rRNA), genes de proteínas del complejo mismatch de reparación de daño a DNA (*mutL* y *mutS*) y el gen *oprH* que codifica una proteína de membrana externa; tanto antes de la desecación como a los 18 DPID. Todos los genes explorados fueron amplificados a partir de muestras de RNA después de 20 minutos de rehidratación cuando células de *P. putida* KT2440 fueron no cultivables, indicando que existe una expresión activa de los genes en estado VBNC y en consecuencia las células permanecen con actividad metabólica. El gen 16S rRNA ha sido ampliamente utilizado para explorar actividad metabólica en el estado VBNC de bacterias (Yaron and Matthews, 2002b; Lahtinen *et al.*, 2008), en este trabajo, fue el primer gen seleccionado para evaluar actividad celular, ya que se observó que los genes ribosómicos estaban activos después de la rehidratación. En *Acinetobacter baumannii* se observó que bajo estrés por desecación la proteína 30S (subunidad del ribosoma donde se encuentra el gen 16srRNA), estaba sobre-expresada en células bajo este estrés (Gayoso *et al.*, 2014) por lo que al ser el gen 16s rRNA altamente conservado y abundante, podría ser un elemento importante para que las bacterias retornen al estado cultivable, ya que tener este complejo proteico activo sería indispensable para mantener funciones vitales de una bacteria no cultivable, teniendo la posibilidad de retornar al estado cultivable con el proceso de traducción

de DNA y síntesis de proteínas activo. El gen *rpoN* codifica al factor  $\sigma^{54}$  de la RNA polimerasa y regula la expresión de varios genes (Hirschman *et al.*, 1985; Dixon, 1986); en esta investigación se utilizó como gen de referencia para realizar ensayos de RT-qPCR. Después del análisis del nivel de expresión usando RT-qPCR, se observó que los genes *oprH*, *mutL* y *mutS* se expresaron en células no cultivables de *P. putida* KT2440 rehidratadas 20 minutos. El gen *oprH* codifica una de las proteínas de membrana más abundantes del género *Pseudomonas*, funcionando principalmente como una acuaporina y una proteína transportadora de fármacos, siendo importante para el mantenimiento y soporte de la membrana; se ha observado que la expresión del gen *oprH* es altamente inducida en condiciones de alta presión de oxígeno, probablemente como consecuencia de la desestabilización de la membrana plasmática que puede estar provocando este tipo de estrés (Follonier *et al.*, 2013). En este trabajo, la expresión del gen *oprH* aumentó en gran medida a los 6 DPID, sugiriendo que la desecación podría provocar desestabilización en las membranas celulares. Estas observaciones pueden sustentar el aumento de células rojas vistas por microscopía de fluorescencia cuando *P. putida* KT2440 estuvo bajo estrés por desecación. A pesar de que, la expresión del gen *oprH* disminuyó a los 12 y 18 DPID, su expresión siempre fue mayor que la observada para los genes *mutL* y *mutS*; por lo tanto, se propone a este gen como un indicador de viabilidad en *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación.

Los genes *mutL* y *mutS*, codifican proteínas del complejo mismatch de reparación de daño a DNA, actúan en la replicación del DNA y están involucrados en procesos de señalización para prevenir daño químico provocado por la desecación, como oxidación, reacciones de Maillard y daño en el DNA (Potts, 1994; Brierley and Martin, 2012); por lo tanto, *mutL* y *mutS* podrían ser genes fundamentales implicados en la reparación del DNA, de células de *P. putida* KT2440 desecadas. Los resultados obtenidos mostraron una disminución en la expresión del gen *mutL* en células no cultivables después de la rehidratación, pero su expresión fue constante en todos los tiempos explorados; por otro lado, la expresión del gen *mutS*, fue similar en células cultivables y no cultivables, por lo que, estos genes podrían estar involucrados en la reparación del DNA en células dañadas por la desecación.

## 2. Genes involucrados con la resistencia a desecación de *P. putida* KT2440

Los genes identificados en las mutantes M280415-27A y M310315-41A tolerantes a desecación corresponden a la UDPN-N-acetilmuramato-L-alanina ligasa la cual se encuentra codificada por el gen *murC*, ambas mutaciones se encuentran en una posición diferente del gen. Esta enzima se encuentra ubicada en el citoplasma y está involucrada en la vía de biosíntesis del peptidoglicano y biosíntesis de pared celular en *P. putida* KT2440 (UniProtKB - Q88N75 (MURC\_PSEPK). Ambas cepas mutantes mostraron ser más tolerantes a la desecación respecto a la cepa silvestre *P. putida* KT2440 por lo que se sugiere que este gen podría ser importante para que las células entren al estado Viable no cultivable y que la membrana plasmática desempeñe un papel importante en la entrada y retorno de este estado. Respecto a la supervivencia de mutantes se ha observado que una cepa de *P. putida* KT2440 deficiente en la producción de alginato presentó una mejor supervivencia bajo estrés hídrico, respecto a la cepa silvestre, sugiriendo que pueden existir otros mecanismos capaces de sustituir esta deficiencia (Gulez *et al.*, 2014).

Para el caso de la mutante 310315-6A el gen mutagenizado corresponde a un transportador putativo de Amonio que se encuentra en la membrana plasmática de *P. putida* KT2440, esta cepa también fue más tolerante a la desecación respecto a la cepa silvestre, por lo que se podría sugerir que algunos componentes de la membrana plasmática podrían estar involucrados con la entrada al estado Viable no Cultivable, siendo en esta parte de la célula donde ocurre la señalización para entrar a un estado de dormancia, ya que como se mencionó anteriormente hubo una mayor expresión del gen *oprH*, el cual es una proteína de membrana con función de acuaporina.

Las mutantes 55-76E2, 65-76G11, 134-53D10 mostraron una resistencia tanto a liofilización como a desecación sugiriendo que los genes que se encuentran mutagenizados tienen un papel en evitar que entren al estado viable no cultivable durante el estrés por liofilización y desecación. La mutante 55-76E2 se encuentra mutagenizada en el gen *oprD* el cual es un componente integral de membrana, con actividad porina, permitiendo el movimiento de macromoléculas, iones y pequeñas moléculas; sugiriendo que las porinas de membrana plasmática desempeñan un papel en la entrada al estado viable cultivable. Se ha reportado que esta proteína fue sobre-expresada

en *P. putida* KT2440 bajo estrés por presencia de fenol, probablemente sufriendo modificaciones postranscripcionales que benefician la supervivencia de *P. putida* KT2440 (Dos Santos *et al.*, 2004). Estudios en *E. coli* bajo estrés por hambre, mostraron un aumento en la concentración de la porina OmpF y la desaparición de la porina OmpA, indicando que esta se pierde a consecuencia de cambios en la membrana plasmática a consecuencia del estrés, proponiendo que OmpF se encarga de mantener la forma de la membrana plasmática durante el estrés (Özkanca and Flint, 2002); es probable que en la mutante en el gen *oprD* de *P. putida* KT2440 la porina podría ser eliminada de la membrana, ya que se observa una disminución en el tamaño de la célula después de la desecación; y en consecuencia no se observa pérdida de viabilidad bajo estrés por desecación. La mutante 134-53D10 tiene una mutación en el gen que codifica para la Citocromo c oxidasa tipo *cbb3*, esta proteína está implicada en la reducción de O<sub>2</sub>. Uno de los mecanismos moleculares de daño que conlleva a la muerte en células sensibles a desecación es el ataque de especies reactivas de oxígeno (Morgan *et al.*, 2006; Muñoz-Celaya *et al.*, 2012). Es interesante observar que la mutante 134-53D10 mostró una resistencia a desecación, lo que sugiere que probablemente la célula tiene la capacidad de compensar la falta de esta proteína evitando la pérdida de viabilidad. La mutante 14-75A1 mostró ser sensible tanto a liofilización como desecación, su mutación se encuentra en el gen PP\_2708, para el que no ha sido reportada una función específica, por lo que resulta interesante estudiar su papel en la pérdida de viabilidad de *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación.

El análisis transcriptómico permitió visualizar la sobre-expresión de 6 genes de *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación (18 días de desecación-rehidratación 20 minutos). El gen PP\_2676 codifica una proteína de unión en el periplasma, la cual está posiblemente relacionada con el transporte activo de solutos a través de la membrana citoplasmática, como monosacáridos, oligopéptidos o aminoácidos hidrofóbicos. El gen PP\_0880 codifica un dipeptido ABC transportador permeasa, el cual lleva a cabo el movimiento de macromoléculas, iones y pequeñas moléculas, hacia fuera o dentro de la célula. Se sabe que en bacterias los transportadores de unión a ATP (ABC) constituyen una parte central del sistema de absorción de nutrientes, translocando una amplia variedad de solutos (azúcares, aminoácidos, metales, factores de crecimiento, iones y otros) a través de la membrana celular. Otros miembros de la familia de

transportadores ABC están involucrados en la transducción de señales, secreción de proteínas, resistencia a fármacos y antibióticos, patogénesis bacteriana y esporulación (Higgs *et al.*, 2002). En condiciones de estrés hídrico se ha observado que transportadores ABC (OpuAA y OpuABC) en *Lactococcus lactis* pueden regular cambios fisiológicos en la membrana, siendo esenciales para la activación osmótica de la vía de glicina-betaína y censando la diferencia entre el potencial externo e interno de todos los solutos osmóticamente activos, siendo este gradiente osmótico transmembranal censado a través de cambios en la bicapa lipídica de la membrana (van der Heide and Poolman, 2000). En un análisis transcriptómico de *Bradyrhizobium japonicum* bajo estrés por desecación, se observó que un transportador de tipo ABC fue sobre-expresado, sugiriendo que podría contribuir a la acumulación de trehalosa intracelular (Cytryn *et al.*, 2007). En este trabajo se propone que los dos genes que codifican para transportadores ABC podrían estar actuando de una manera similar en *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación.

El gen PP\_1446 es un receptor dependiente de TonB; esta proteína interactúa con proteínas receptoras de la membrana externa para llevar a cabo una unión de alta afinidad y dependiente de energía de sustratos específicos dentro del espacio periplásmico. En bacterias Gram-negativas se requiere del complejo *exbBexbDtonB* para la absorción de hierro; *exbB* y *exbD* se encuentran embebidas en la membrana citoplasmática, mientras que *exbE* se proyecta hacia el espacio periplásmico, al parecer TonB interactúa con estas dos proteínas en el interior de la membrana y cruza a lo largo del espacio periplásmico a través de segmentos de Pro-Glu y Pro-Lys, para alcanzar la membrana externa, donde interactúa con diferentes receptores de hierro y con receptores de vitamina B12 (Heller *et al.*, 1988; Bell *et al.*, 1990; Braun, 1995; Higgs *et al.*, 2002). Se ha propuesto un ciclo en el que la proteína TonB es inicialmente energizada en el interior de la membrana, posteriormente la energía es transferida a receptores de la membrana externa para importar, por ejemplo, complejos de Fe-sideroforos frente a un gradiente de concentración hacia el espacio periplásmico (Larsen *et al.*, 1999), posteriormente estos complejos son incorporados al citoplasma vía transportadores ABC. En *P. putida* DOT-T1E, se ha observado que *tonB* podría trabajar como un sistema de transducción de energía en la operación de bombas de eflujo y procesos relacionados con la multidrogo-resistencia (Godoy *et al.*, 2004); es probable que en *P.*

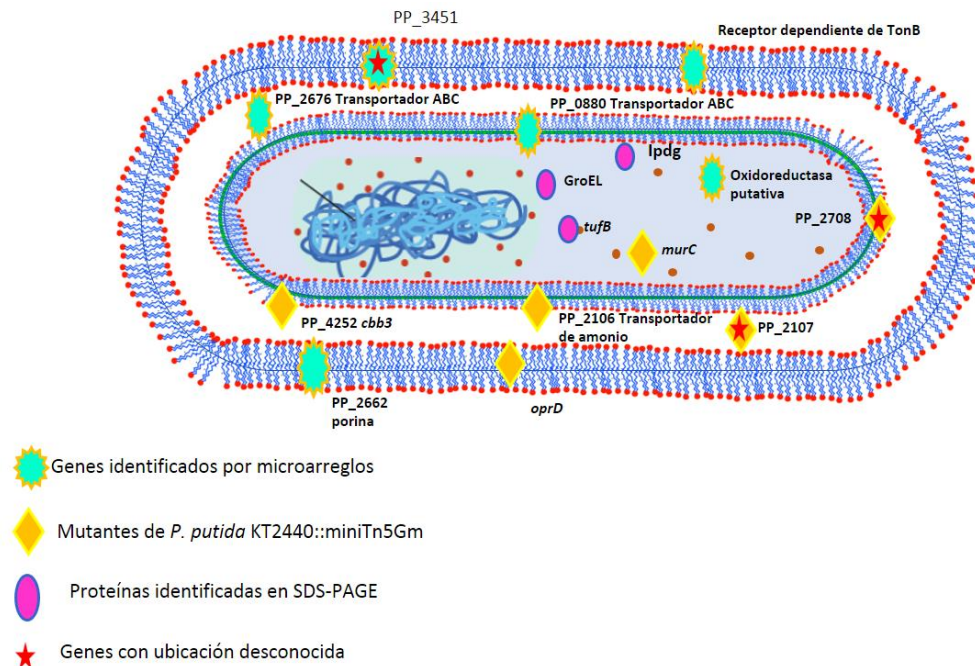
*putida* KT2440 este gen pudiera estar participando en la expulsión de moléculas extrañas o tóxicas formadas a consecuencia de la desecación.

El gen PP\_0256 codifica para una oxidorreductasa putativa (subunidad  $\alpha$  de molibdopterina). Se ha sugerido que el estrés por pérdida de agua incrementa la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), produciendo peroxidación de lípidos, desnaturalización de proteínas, daño en ácidos nucleicos y severas consecuencias en el metabolismo (Miller *et al.*, 2010). Los organismos aerobios poseen mecanismos de defensa ante el estrés oxidativo, para evitar o disminuir los daños causados por aumento en las ROS. La primera respuesta de un organismo ante condiciones de estrés oxidativo incluye la activación de enzimas antioxidantes, el uso de compuestos antioxidantes solubles en agua y moléculas antioxidantes liposolubles (Foyer *et al.*, 1997; Noctor *et al.*, 2014), en esta investigación proponemos que la sobre-expresión de una oxidorreductasa pudiera estar contribuyendo a la línea de defensa contra el estrés oxidativo provocado por la desecación.

Los genes PP\_3451 y PP\_2662 tienen función desconocida, sin embargo, es posible que tengan un papel importante en la forma de tolerancia a desecación de *P. putida* KT2440, resultando de gran interés seguir estudiando estos genes.

En resumen tomando en cuenta la información recabada sobre los genes identificados, llevando a cabo las tres metodologías antes mencionadas (Fig. 26), en este trabajo se propone que los genes que llevan a cabo funciones de transporte activo podrían ayudar a la detoxificación en la célula, ya que podrían estar acumulando sustancias nocivas que podrían conducir a la muerte celular, además podrían estar favoreciendo cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática, y es la razón por la que se observan bacterias rojas después de 18 días de desecación usando el kit LIVE/DEAD, el gen PP\_0256 que se propone funciona como una oxidorreductasa putativa, podría contribuir a la línea de defensa en contra de las ROS que pudieran estar acumulando a causa de la desecación. Los genes PP\_2662 y el gen PP\_3451 tienen un papel importante en la tolerancia a desecación de esta bacteria y es probable desempeñen funciones relacionadas a la entrada y retorno al estado VBNC. Los genes que fueron identificados por mutagénesis desempeñan un papel importante para la entrada al estado VBNC ya que las cepas mutantes en estos genes no mostraron este fenotipo, por lo que es probable sus funciones sean

parte de la señalización que lleva a cabo *P. putida* KT2440 para usar esta estrategia en contra de la desecación. El gen PP\_2708 no tiene una función asignada, pero resulta de interés conocer su papel en la tolerancia a desecación ya que la cepa mutante en este gen resultó ser sensible tanto a liofilización como a desecación. Dentro de las proteínas identificadas en *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación por 18 días, la proteína TufB podría estar favoreciendo la adaptación de las células al estrés ya que podría estar participando no sólo en la síntesis de proteínas específicas, sino también en el aumento general de la traducción de proteínas necesarias para enfrentar el estrés, tal y cómo se ha observado en *P. fluorescens* bajo estrés por presencia de metales pesados (Sharma *et al.*, 2006). Por otro lado la proteína GroEL podría favorecer a la estabilización de proteínas evitando plegamientos erróneos que pudieran ocurrir durante la desecación, tal y cómo se ha observado en *P. putida* bajo estrés hídrico (Hallsworth *et al.*, 2003).



**Figura 26.** Esquema propuesto que muestra la ubicación y función de los genes y proteínas identificados en *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación durante 18 días

### 3. Cambios en la cantidad de DNA de *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación

*P. putida* KT2440 mostró una disminución significativa entre la cantidad de ADN antes y después de 18 días de desecación. Estudios realizados en esporas de *Bacillus subtilis* sometidas a calor seco muestran que hay pequeñas proteínas denominadas SASP (small, acid-soluble protein) asociadas al DNA que evitan rompimientos en este, disminuyendo la tasa de despurinización y sugiriendo que estas proteínas brindan protección para evitar mayores daños en el DNA de las esporas (Setlow and Setlow, 1995), en el caso de *P. putida* no hay estudios que muestren si estas u otras proteínas se encuentren asociadas al DNA cuando es sometida algún estrés. Otra explicación puede basarse en que la membrana plasmática se hace más rígida con la pérdida de agua intracelular, se ha reportado que la remoción de agua en las membranas plasmáticas incrementa las fuerzas de van der Waal's entre los lípidos adyacentes causando un incremento en la temperatura media a la cual ocurre la transición de fase de la membrana ( $T_m$ ), pasando de una fase líquida a una fase de gel, en esta fase de gel ocurre una disminución de la fluidez de la membrana debido al denso empaquetamiento de las cabezas de lípidos, incremento de la cadena acil lipídica e incremento en el espesor de la membrana (Scherber *et al.*, 2009). Como se mencionó anteriormente podrían existir algún tipo de moléculas, ya sea de naturaleza proteica o no, o alguna respuesta que tenga *P. putida* como protección para evitar el daño o degradación del ADN a causa de la pérdida de agua, y probablemente no se logre eliminar con la lisis celular y al haber una rehidratación prolongada este desaparezca y sea el motivo por el cual se observa un aumento en la cantidad de ADN.



## IX. CONCLUSIONES

- *P. putida* KT2440 tiene una baja tolerancia a la desecación en aire en comparación con otras bacterias; sin embargo, la trehalosa es capaz de protegerla del estrés manteniendo su viabilidad.
- *P. putida* KT2440 entra al estado VBNC durante la desecación, como estrategia para enfrentar el estrés.
- *P. putida* KT2440 recupera más rápidamente su viabilidad en presencia de exudados de maíz en germinación y exudados de plantas de maíz
- Células *P. putida* KT2440 en un estado desecado tienen un tamaño celular reducido y el citoplasma retraído.
- La desecación causa daño en las membranas de *P. putida* KT2440, teniendo, aparentemente la capacidad de repararse después de una rehidratación prolongada o rehidratación en presencia de exudados de la raíz de la planta.
- El ácido Cis-10-Heptadecenoico (C17:1n-7) de *P. putida* KT2240, aumenta considerablemente su concentración bajo estrés por desecación.
- Después de un corto período de rehidratación, las células bacterianas no son capaces de crecer en medios de cultivo (estado VBNC); sin embargo, se detectó la transcripción de distintos genes indicando que las células permanecen activas
- Se identificaron 6 genes de *P. putida* KT2440::miniTn5Gm con una posible relación en la tolerancia a desecación.

- Los genes *murC* y *PP\_2106* son importantes para la entrada al estado viable no cultivable en *P. putida* KT2440, ya que cepas mutantes no presentan este fenotipo bajo estrés por desecación
- El gen *PP\_2708* tiene una posible función en la entrada al estado VBNC en *P. putida* KT2440, ya que la cepa mutante en este gen pierde su viabilidad bajo estrés por desecación
- Se identificaron los genes *PP\_2662*, *PP\_1446*, *PP\_2676*, *PP\_0256*, *PP\_3451* y *PP\_0880* sobre-expresados en *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación por 18 DPID y una rehidratación corta
- Se comprobó que los genes *PP\_2662*, *PP\_1446*, *PP\_2676*, *PP\_0256* y *PP\_3451* se sobre-expresan en células de *P. putida* KT2440 después de 18 DPID con 20 minutos de rehidratación
- Se identificaron 112 genes sobreexpresados y 39 genes reprimidos en células de *P. putida* KT2440 bajo estrés por desecación por 18 DPID y 24 horas de rehidratación
- Las proteínas TufB y GroEL se expresan bajo estrés por desecación, sugiriendo un papel en la tolerancia a desecación de *P. putida* KT2440
- La cantidad de DNA en *P. putida* KT2440 disminuye cuando se enfrenta a la desecación por 18 días, teniendo una aparente recuperación en células con 18 días de desecación y 72 horas de rehidratación.

## Referencias

- Alpert, P. (2005) The Limits and Frontiers of Desiccation-Tolerant Life1. *Integr Comp Biol* **45**: 685–695.
- Baez, A., Flores, N., Bolívar, F., and Ramírez, O.T. (2009) Metabolic and transcriptional response of recombinant *Escherichia coli* to elevated dissolved carbon dioxide concentrations. *Biotechnol Bioeng* **104**: 102–110.
- Bagdasarian, M., Lurz, R., Rückert, B., Franklin, F.C.H., Bagdasarian, M.M., Frey, J., and Timmis, K.N. (1981) Specific-purpose plasmid cloning vectors II. Broad host range, high copy number, RSF 1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* **16**: 237–247.
- Barnard, R.L., Osborne, C.A., and Firestone, M.K. (2013) Responses of soil bacterial and fungal communities to extreme desiccation and rewetting. *Isme J* **7**: 2229.
- Bashan, Y. (1998) Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol Adv* **16**: 729–770.
- Bell, P.E., Nau, C.D., Brown, J.T., Konisky, J., and Kadner, R.J. (1990) Genetic suppression demonstrates interaction of TonB protein with outer membrane transport proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**: 3826 LP – 3829.
- Beney, L., Mille, Y., and Gervais, P. (2004) Death of *Escherichia coli* during rapid and severe dehydration is related to lipid phase transition. *Appl Microbiol Biotechnol* **65**: 457–464.
- Billi, D. and Potts, M. (2002) Life and death of dried prokaryotes. *Res Microbiol* **153**: 7–12.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Can J Biochem Physiol* **37**: 911–917.
- Braun, V. (1995) Energy-coupled transport and signal transduction through the Gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiol Rev* **16**: 295–307.
- Brierley, D.J. and Martin, S.A. (2012) Oxidative Stress and the DNA Mismatch Repair Pathway. *Antioxid Redox Signal* **18**: 2420–2428.
- Buck, A. and Oliver, J.D. (2010) Survival of spinach-associated *Helicobacter pylori* in the viable but nonculturable state. *Food Control* **21**: 1150–1154.

- Conway, T. and Schoolnik, G.K. (2003) Microarray expression profiling: Capturing a genome-wide portrait of the transcriptome. *Mol Microbiol* **47**: 879–889.
- Corral-Lugo, A., Morales-García, Y.E., Pazos-Rojas, L.A., Ramírez-Valverde, A., Martínez-Contreras, R.D., and Muñoz-Rojas, J. (2012) Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de “Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo.” *Rev Colomb Biotecnol* **XIV**: 147–156.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M., Carpenter, J.F., and Aurell Wistrom, C. (1987) Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem J* **242**: 1–10.
- Crowley, D.E., Wang, Y.C., Reid, C.P.P., and Szaniszlo, P.J. (1991) Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants BT - Iron Nutrition and Interactions in Plants: “Proceedings of the Fifth International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants”, 11–17 June 1989, Jerusalem, Isr. In, Chen, Y. and Hadar, Y. (eds). Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 213–232.
- Cytryn, E.J., Sangurdekar, D.P., Streeter, J.G., Franck, W.L., Chang, W., Stacey, G., et al. (2007) Transcriptional and Physiological Responses of Bradyrhizobium japonicum to Desiccation-Induced Stress. *J Bacteriol* **189**: 6751 LP – 6762.
- Dixon, R. (1986) The xylABC promoter from the Pseudomonas putida TOL plamid is activated by nitrogen regulatory genes in Escherichia coli. *Mol Gen Genet MGG* **203**: 129–136.
- Dobereiner, J., Urquiaga, S., and Boddey, R.M. (1996) Alternatives for nitrogen nutrition of crops in tropical agriculture BT - Nitrogen Economy in Tropical Soils: Proceedings of the International Symposium on Nitrogen Economy in Tropical Soils, held in Trinidad, W.I., January 9–14, 1994. In, Ahmad, N. (ed). Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 338–346.
- Dopp, E., Richard, J., Dwidjosiswojo, Z., Simon, A., and Wingender, J. (2017) Influence of the copper-induced viable but non-culturable state on the toxicity of Pseudomonas aeruginosa towards human bronchial epithelial cells in vitro. *Int J Hyg Environ Health* **220**: 1363–1369.
- Espinosa-Urgel, M., Kolter, R., and Ramos, J.-L. (2002) Root colonization by Pseudomonas putida: love at first sight. *Microbiology* **148**: 341–343.
- Follonier, S., Escapa, I.F., Fonseca, P.M., Henes, B., Panke, S., Zinn, M., and Prieto, M.A. (2013) New insights on the reorganization of gene transcription in Pseudomonas putida KT2440 at

- elevated pressure. *Microb Cell Fact* **12**: 30.
- Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F., and Scott, I.M. (1997) Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol Plant* **100**: 241–254.
- Gayoso, C.M., Mateos, J., Méndez, J.A., Fernández-Puente, P., Rumbo, C., Tomás, M., et al. (2014) Molecular Mechanisms Involved in the Response to Desiccation Stress and Persistence in *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res* **13**: 460–476.
- Godoy, P., Ramos-González, M.-I., and Ramos, J.L. (2004) *Pseudomonas putida* mutants in the *exbBexBDtonB* gene cluster are hypersensitive to environmental and chemical stressors. *Environ Microbiol* **6**: 605–610.
- Gulez, G., Altıntaş, A., Fazli, M., Dechesne, A., Workman, C.T., Tolker-Nielsen, T., and 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 matric potentials. *Microbiologyopen* **3**: 457–469.
- Hallsworth, J.E., Heim, S., and Timmis, K.N. (2003) Chaotropic solutes cause water stress in *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* **5**: 1270–1280.
- He, H., Chen, Y., Li, X., Cheng, Y., Yang, C., and Zeng, G. (2017) Influence of salinity on microorganisms in activated sludge processes: A review. *Int Biodeterior Biodegradation* **119**: 520–527.
- van der Heide, T. and Poolman, B. (2000) Osmoregulated ABC-transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 7102 LP – 7106.
- Heil, M. and Bostock, R.M. (2002) Induced Systemic Resistance (ISR) Against Pathogens in the Context of Induced Plant Defences. *Ann Bot* **89**: 503–512.
- Heller, K.J., Kadner, R.J., and Günther, K. (1988) Suppression of the *btuB451* mutation by mutations in the *tonB* gene suggests a direct interaction between TonB and TonB-dependent receptor proteins in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Gene* **64**: 147–153.
- Higgs, P.I., Larsen, R.A., and Postle, K. (2002) Quantification of known components of the *Escherichia coli* TonB energy transduction system: TonB, ExbB, ExbD and FepA. *Mol*

*Microbiol* **44**: 271–281.

- Hingston, P.A., Piercey, M.J., and Truelstrup Hansen, L. (2015) Genes Associated with Desiccation and Osmotic Stress in *Listeria monocytogenes* as Revealed by Insertional Mutagenesis. *Appl Environ Microbiol* **81**: 5350 LP – 5362.
- Hirschman, J., Wong, P.K., Sei, K., Keener, J., and Kustu, S. (1985) Products of nitrogen regulatory genes *ntrA* and *ntrC* of enteric bacteria activate *glnA* transcription in vitro: evidence that the *ntrA* product is a sigma factor. *Proc Natl Acad Sci* **82**: 7525 LP – 7529.
- Ivanova, I.A., Kambarev, S., Popova, R.A., Naumovska, E.G., Markoska, K.B., and Dushkin, C.D. (2010) Determination of *Pseudomonas putida* Live Cells with Classic Cultivation and Staining with “Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit.” *Biotechnol Biotechnol Equip* **24**: 567–570.
- Krell, T., Lacal, J., Reyes-Darias, J.A., Jimenez-Sanchez, C., Sungthong, R., and Ortega-Calvo, J.J. (2013) Bioavailability of pollutants and chemotaxis. *Curr Opin Biotechnol* **24**: 451–456.
- Lahtinen, S.J., Ahokoski, H., Reinikainen, J.P., Gueimonde, M., Nurmi, J., Ouwehand, A.C., and Salminen, S.J. (2008) Degradation of 16S rRNA and attributes of viability of viable but nonculturable probiotic bacteria. *Lett Appl Microbiol* **46**: 693–698.
- Larsen, R.A., Thomas, M.G., and Postle, K. (1999) Protonmotive force, ExbB and ligand-bound FepA drive conformational changes in TonB. *Mol Microbiol* **31**: 1809–1824.
- Liu, Y., Wang, C., Fung, C., and Li, X.-F. (2010) Quantification of Viable but Nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 by Targeting the *rpoS* mRNA. *Anal Chem* **82**: 2612–2615.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* **25**: 402–408.
- Lleò, M.M., Bonato, B., Tafi, M.C., Signoretto, C., Boaretti, M., and Canepari, P. (2001) Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. *J Appl Microbiol* **91**: 1095–1102.
- Lucy, M., Reed, E., and Glick, B.R. (2004) Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **86**: 1–25.
- Manzanera, M., García de Castro, A., Tøndervik, A., Rayner-Brandes, M., Strøm, A.R., and Tunnacliffe, A. (2002) Hydroxyectoine Is Superior to Trehalose for Anhydrobiotic

- Engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Environ Microbiol* **68**: 4328 LP – 4333.
- Maron, P.-A., Mougel, C., and Ranjard, L. (2011) Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. *C R Biol* **334**: 403–411.
- Matilla, M.A. and Krell, T. (2018) Plant Growth Promotion and Biocontrol Mediated by Plant-Associated Bacteria BT - Plant Microbiome: Stress Response. In, Egamberdieva, D. and Ahmad, P. (eds). Singapore: Springer Singapore, pp. 45–80.
- Matilla, M.A., Ramos, J.L., Bakker, P.A.H.M., Doornbos, R., Badri, D. V, Vivanco, J.M., and Ramos-González, M.I. (2010) *Pseudomonas putida* KT2440 causes induced systemic resistance and changes in *Arabidopsis* root exudation. *Environ Microbiol Rep* **2**: 381–388.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., and Mittler, R. (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ* **33**: 453–467.
- Molina-Romero, D., Baez, A., Quintero-Hernández, V., Castañeda-Lucio, M., Fuentes-Ramírez, L.E., Bustillos-Cristales, M. del R., et al. (2017) Compatible bacterial mixture, tolerant to desiccation, improves maize plant growth. *PLoS One* **12**: e0187913.
- Morales-García, Y.E., Juárez-Hernández, D., Aragón-Hernández, C., Mascarua-Esparza, M.A., Bustillos-Cristales, M.R., Fuentes-Ramírez, L.E., et al. (2011) Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter* spp., as a model for alternative agriculture. *Rev Argent Microbiol* **43**: 287–293.
- Morgan, C.A., Herman, N., White, P.A., and Vesey, G. (2006) Preservation of micro-organisms by drying; A review. *J Microbiol Methods* **66**: 183–193.
- Muñoz-Celaya, A.L., Ortiz-García, M., Vernon-Carter, E.J., Jauregui-Rincón, J., Galindo, E., and Serrano-Carreón, L. (2012) Spray-drying microencapsulation of *Trichoderma harzianum* conidia in carbohydrate polymers matrices. *Carbohydr Polym* **88**: 1141–1148.
- Muñoz-Rojas, J., Bernal, P., Duque, E., Godoy, P., Segura, A., and Ramos, J.-L. (2006) Involvement of Cyclopropane Fatty Acids in the Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to Freeze-Drying. *Appl Environ Microbiol* **72**: 472 LP – 477.
- Muñoz-Rojas, J. and Caballero-Mellado, J. (2003) Population Dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in Sugarcane Cultivars and Its Effect on Plant Growth. *Microb Ecol* **46**: 454–

464.

- Mwita, L., Chan, W.Y., Pretorius, T., Lyantagaye, S.L., Lapa, S. V, Avdeeva, L. V, and Reva, O.N. (2016) Gene expression regulation in the plant growth promoting *Bacillus atrophaeus* UCMB-5137 stimulated by maize root exudates. *Gene* **590**: 18–28.
- Mykytczuk, N.C.S., Trevors, J.T., Leduc, L.G., and Ferroni, G.D. (2007) Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress. *Prog Biophys Mol Biol* **95**: 60–82.
- Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A.P., et al. (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **4**: 799–808.
- Noctor, G., Mhamdi, A., and Foyer, C.H. (2014) The Roles of Reactive Oxygen Metabolism in Drought: Not So Cut and Dried. *Plant Physiol* **164**: 1636 LP – 1648.
- Oliveira, A.L.M. de, Costa, K.D.R., Ferreira, D.C., Milani, K.M.L., Dos Santos, O.J.A.P., Silva, M.B., and Zuluaga, M.Y.A. (2014) Aplicações da biodiversidade bacteriana do solo para a sustentabilidade da agricultura. *BBR - Biochem Biotechnol Reports* **3**: 56.
- Oliver, J.D. (2010) Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 415–425.
- Oliver, J.D. (2000) The Public Health Significance of Viable but Nonculturable Bacteria BT - Nonculturable Microorganisms in the Environment. In, Colwell, R.R. and Grimes, D.J. (eds). Boston, MA: Springer US, pp. 277–300.
- Oliver, J.D. (2005) The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* **43 Spec No**: 93–100.
- Orruño, M., Kaberdin, V.R., and Arana, I. (2017) Survival strategies of *Escherichia coli* and *Vibrio* spp.: contribution of the viable but nonculturable phenotype to their stress-resistance and persistence in adverse environments. *World J Microbiol Biotechnol* **33**: 45.
- Özkanca, R. and Flint, K.P. (2002) The effect of starvation stress on the porin protein expression of *Escherichia coli* in lake water. *Lett Appl Microbiol* **35**: 533–537.
- Parra, Y. and Cuevas, F. (2001) Potencialidades de *Azospirillum* como inoculante para la agricultura. *Cultiv Trop* **23**: 31–41.



- Pazos-rojas, L.A., Rodríguez-andrade, O., Muñoz-arenas, L.C., Morales-, Y.E., Corral-lugo, A., Quintero-hernández, V., et al. (2018) Desiccation-tolerant rhizobacteria maintain their plant growth- promoting capability after experiencing extreme water stress. **1**.
- Pierobon, S., Tafi, M.C., Lleo, M.A.R., Signoretto, C., and Canepari, P. (2000) mRNA Detection by Reverse Transcription-PCR for Monitoring Viability over Time in an. *Society* **66**: 4564–4567.
- Pineda-Molina, E., Reyes-Darias, J.-A., Lacal, J., Ramos, J.L., García-Ruiz, J.M., Gavira, J.A., and Krell, T. (2012) Evidence for chemoreceptors with bimodular ligand-binding regions harboring two signal-binding sites. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 18926 LP – 18931.
- Potts, M. (1994) Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev* **58**: 755 LP – 805.
- Potts, M., Slaughter, S.M., Hunneke, F.-U., Garst, J.F., and Helm, R.F. (2005) Desiccation Tolerance of Prokaryotes: Application of Principles to Human Cells1. *Integr Comp Biol* **45**: 800–809.
- Ramos-González, M.I., Ramos-Díaz, M.A., and Ramos, J.L. (1994) Chromosomal gene capture mediated by the *Pseudomonas putida* TOL catabolic plasmid. *J Bacteriol* **176**: 4635 LP – 4641.
- Ramos, J.L., Duque, E., Godoy, P., and Segura, A. (1998) Efflux Pumps Involved in Toluene Tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J Bacteriol* **180**: 3323 LP – 3329.
- Robben, C., Fister, S., Witte, A.K., Schoder, D., Rossmanith, P., and Mester, P. (2018) Induction of the viable but non-culturable state in bacterial pathogens by household cleaners and inorganic salts. *Sci Rep* **8**: 15132.
- Rodríguez-Andrade, O., Fuentes-Ramírez, L.E., Morales-García, Y.E., Molina-Romero, D., Bustillos-Cristales, M.R., Martínez-Contreras, R.D., and Muñoz-Rojas, J. (2015) The decrease in the population of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane after nitrogen fertilization is related to plant physiology in split root experiments. *Rev Argent Microbiol* **47**: 335–343.
- Rozsak, D.B. and Colwell, R.R. (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol Rev* **51**: 365–379.
- Dos Santos, V.A.P.M., Heim, S., Moore, E.R.B., Strätz, M., and Timmis, K.N. (2004) Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **6**:

1264–1286.

- Scherber, C.M., Schottel, J.L., and Aksan, A. (2009) Membrane phase behavior of *Escherichia coli* during desiccation, rehydration, and growth recovery. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1788**: 2427–2435.
- Setlow, B. and Setlow, P. (1995) Small, acid-soluble proteins bound to DNA protect *Bacillus subtilis* spores from killing by dry heat. *Appl Environ Microbiol* **61**: 2787 LP – 2790.
- Sharma, S., Sundaram, C.S., Luthra, P.M., Singh, Y., Sirdeshmukh, R., and Gade, W.N. (2006) Role of proteins in resistance mechanism of *Pseudomonas fluorescens* against heavy metal induced stress with proteomics approach. *J Biotechnol* **126**: 374–382.
- da Silva Lima, L., Olivares, F.L., Rodrigues de Oliveira, R., Vega, M.R.G., Aguiar, N.O., and Canellas, L.P. (2014) Root exudate profiling of maize seedlings inoculated with *Herbaspirillum seropedicae* and humic acids. *Chem Biol Technol Agric* **1**: 23.
- de Souza, R., Ambrosini, A., and Passaglia, L.M.P. (2015) Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet Mol Biol* **38**: 401–419.
- Stokell, J.R. and Steck, T.R. (2012) Viable but Nonculturable Bacteria. *eLS*.
- Streeter, J.G. (2003) Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. *J Appl Microbiol* **95**: 484–491.
- Timmis, K.N. (2002) *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environ Microbiol* **4**: 779–781.
- Torsvik, V. and Øvreås, L. (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol* **5**: 240–245.
- Trevors, J.T. (2011) Viable but non-culturable (VBNC) bacteria: Gene expression in planktonic and biofilm cells. *J Microbiol Methods* **86**: 266–273.
- Vessey, J.K. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* **255**: 571–586.
- Vilchez, S. and Manzanera, M. (2011) Biotechnological uses of desiccation-tolerant microorganisms for the rhizoremediation of soils subjected to seasonal drought. *Appl Microbiol Biotechnol* **91**: 1297.
- Vriezen, J.A.C. and de Bruijn, F.J. (2015) Appearance of Membrane Compromised, Viable but Not

Culturable and Non-culturable Rhizobial Cells as a Consequence of Desiccation. *Biol Nitrogen Fixat* 975–990.

- Vriezen, J.A.C., de Bruijn, F.J., and Nüsslein, K.R. (2012) Desiccation induces viable but Non-culturable cells in *Sinorhizobium meliloti* 1021. *AMB Express* **2**: 1–9.
- Wackett, L.P. (2003) *Pseudomonas putida*—a versatile biocatalyst. *Nat Biotechnol* **21**: 136–138.
- Walker, T.S., Bais, H.P., Grotewold, E., and Vivanco, J.M. (2003) Root Exudation and Rhizosphere Biology. *Plant Physiol* **132**: 44 LP – 51.
- Wu, X., Monchy, S., Taghavi, S., Zhu, W., Ramos, J., and van der Lelie, D. (2011) Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 299–323.
- Yaron, S. and Matthews, K.R. (2002a) A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* O157:H7: investigation of specific target genes. *J Appl Microbiol* **92**: 633–640.
- Yaron, S. and Matthews, K.R. (2002b) A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* O157:H7: Investigation of specific target genes. *J Appl Microbiol* **92**: 633–640.
- Zhao, X., Zhong, J., Wei, C., Lin, C.-W., and Ding, T. (2017) Current Perspectives on Viable but Non-culturable State in Foodborne Pathogens. *Front Microbiol* **8**: 580.

## ANEXO 1

### Extracción de RNA por método de fenol caliente

1. Preparar tubos eppendorff (1.5 mL) con ácido fenol:cloroformo y calentarlos a 60 °C
2. Centrifugar la(s) muestra(s) a 4000 rpm y 4 °C durante 10 minutos, posteriormente descartar sobrenadante.
3. Resuspender el pellet en 500 µL de la solución A (SDS 0.5%, NaAc 20mM y EDTA 10mM) y vortexear, inmediatamente agregar 500 µL de ácido fenol:cloroformo precalentado y nuevamente agitar en un vortex.
4. Incubar a 60 °C -65 °C durante 10 minutos
5. Centrifugar durante 10 minutos a 14000 rpm.
6. Con mucho cuidado remover el sobrenadante en tubo eppendorff nuevo y retirar la primera fase (fase acuosa)
7. Agregar nuevamente 500 µL de ácido fenol:cloroformo precalentado y agitar vigorosamente en vortex
8. Centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos
9. Con mucho cuidado remover el sobrenadante en tubo eppendorff nuevo y retirar la primera fase (fase acuosa) y agregar 500 µL de fenol-cloroformo-isoamil-alcohol
10. Centrifugar a 14000 rpm durante 10 minutos
11. Remover la fase acuosa y repetir el paso 9
12. Retirar la fase acuosa en un tubo nuevo y agregar 2.5 volúmenes de etanol absoluto y colocar a -80 °C durante 15 minutos o toda la noche
13. Centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos
14. Desechar el sobrenadante y al pellet agregar 400 µL de etanol al 70%.
15. Resuspender el pellet y centrifugar a 14000 rpm durante 15 minutos
16. Decantar el sobrenadante y extraer los restos de etanol. Dejar que se evapore a temperatura ambiente.
17. Resuspender el pellet con 50 µL de agua DEPC

18. Determinar la concentración y pureza tomando en cuenta que la relación 260/280 debe ser lo más cercana a 2 y la relación 260/230 lo ms cercana a 1.8)
19. Almacenar a -80 °C

**Nota:** La solución A debe prepararse con agua DEPC, así como el etanol al 70%. Todos los tubos, superficies, micropipetas deben ser tratadas con RNAsa y durante todo el proceso las muestras deben mantenerse en hielo

## ANEXO 2

### Metodología de Bligh y Dyer para el aislamiento de lípidos totales

Partir de un cultivo bacteriano en fase estacionaria o fase que se desee trabajar.

- 1) Centrifugar a 8000rpm a 4°C durante 10 minutos y decantar el sobrenadante. El pellet bacteriano puede ser guardado a -20°C para trabajarlo en días posteriores.
- 2) Preparar una suspensión (Mix)  
5 volúmenes de cloroformo  
10 volúmenes de metanol  
4 volúmenes de agua
- 3) Adicionar 20 ml del mix al pellet bacteriano y vortexear enérgicamente durante 1 minuto, o hasta que la suspensión quede homogénea,
- 4) Adicionar a la suspensión 5ml de cloroformo y vortexear hasta homogenizar.
- 5) Adicionar 5 ml de agua y vortexear por tiempo suficiente hasta que la suspensión sea homogénea y lechosa.
- 6) Centrifugar la suspensión a 3600g por 10 minutos a 4°C, la suspensión se separará en 3 fases (Acuosa, Interfase y cloroformo). La fase donde se encuentran los lípidos es la de cloroformo (fase que se observa abajo)
- 7) Retirar con una pipeta la fase superior con mucho cuidado.
- 8) Con una pipeta limpia colectar la fase de cloroformo (inferior) tratando de no ensuciar mucho la pipeta con el contenido de la interfase. La fase de cloroformo colectada se guarda en un tubo para rotavapor limpio y seco a -20°C. (Puede ser almacenado algunos días).
- 9) Evaporar el cloroformo en un rotavapor hasta sequedad completa.
- 10) Los lípidos concentrados se disuelven en una solución de hexano adicionando NaOH 1N.
- 11) La parte superior contiene el hexano con los lípidos. Tomar 100µl de esta y colocar en un tubo eppendorff limpio. Tomar 1 µl de la muestra para pinchar en el cromatógrafo de gases-masa para realizar la cromatografía e identificación de los lípidos presentes en la muestra.

Redactar

- Recibidos 164
- ★ Destacados
- 🕒 Pospuestos
- 📌 Importantes
- Enviados
- 🗑 Borradores 7
- 📁 Categorías
- 👤 Facturas personales 36
- ▼ Más

## PONE-D-18-34522R2: Final Decision Being Processed - [EMID:87e3bdc9b0868be9]

[Recibidos x]

**PLOS ONE** <em@editorialmanager.com>

para mí ▾

9:31 (hace 3 horas) ☆ ↶ ⋮

🌐 inglés ▾ > español ▾ Traducir mensaje
Desactivar para: inglés x

---

You are being carbon copied ("cc:'d") on an e-mail "To" "Jesús Muñoz-Rojas" [joymerre@hotmail.com](mailto:joymerre@hotmail.com)  
 CC: "Laura Abisai Pazos-Rojas" [laura.pazos@isu.edu.mx](mailto:laura.pazos@isu.edu.mx), "Ligia Catalina Muñoz-Arenas" [ljiacatalina.munoz@ucpaep.mx](mailto:ljiacatalina.munoz@ucpaep.mx), "Osvaldo Rodríguez-Andrade" [rao\\_154@yahoo.com.mx](mailto:rao_154@yahoo.com.mx), "Lesther Emanuel López-Cruz" [emmanuel\\_52@hotmail.com](mailto:emmanuel_52@hotmail.com), "Orestes López-Ortega" [olopezortega@outlook.com](mailto:olopezortega@outlook.com), "Fábio Lopes-Olivares" [fabio.olivares@gmail.com](mailto:fabio.olivares@gmail.com), "Silvia Luna-Suarez" [silvia2004@yahoo.com.mx](mailto:silvia2004@yahoo.com.mx), "Antonio Baez" [baezro@gmail.com](mailto:baezro@gmail.com), "Yolanda Elizabeth Morales-García" [lissiamor@yahoo.com.mx](mailto:lissiamor@yahoo.com.mx), "Verónica Quintero-Hernández" [yquinterohe@conacyt.mx](mailto:yquinterohe@conacyt.mx), "Miguel Angel Villalobos-López" [mwillalobosl@ion.mx](mailto:mwillalobosl@ion.mx), "Jesús De la Torre" [jesus.delatorre@eez.csic.es](mailto:jesus.delatorre@eez.csic.es)

Desiccation-induced viable but nonculturable state in *Pseudomonas putida* KT2440, a survival strategy  
 PONE-D-18-34522R2

Dear Dr. Muñoz-Rojas,

We are pleased to inform you that your manuscript has been judged scientifically suitable for publication and will be formally accepted for publication once it complies with all outstanding technical requirements.

Within one week, you will receive an e-mail containing information on the amendments required prior to publication. When all required modifications have been addressed, you will receive a formal acceptance letter and your manuscript will proceed to our production department and be scheduled for publication.

Shortly after the formal acceptance letter is sent, an invoice for payment will follow. To ensure an efficient production and billing process, please log into Editorial Manager at <https://www.editorialmanager.com/pone/>, click the "Update My Information" link at the top of the page, and update your user information. If you have any billing related questions, please contact our Author Billing department directly at [authorbilling@plos.org](mailto:authorbilling@plos.org).

If your institution or institutions have a press office, please notify them about your upcoming paper to enable them to help maximize its impact. If they will be preparing press materials for this manuscript, you must inform our press team as soon as possible and no later than 48 hours after receiving the formal acceptance. Your manuscript will remain under strict press embargo until 2 pm Eastern Time on the date of publication. For more information, please contact [onepress@plos.org](mailto:onepress@plos.org).

With kind regards,

Seon-Woo Lee, Ph.D.  
 Academic Editor  
 PLOS ONE

Additional Editor Comments (optional):

Reviewers' comments:

**PLOS ONE**  
**Desiccation-induced viable but nonculturable state in *Pseudomonas putida* KT2440, a survival strategy**  
 –Manuscript Draft–

<b>Manuscript Number:</b>	PONE-D-18-34522R2
<b>Article Type:</b>	Research Article
<b>Full Title:</b>	Desiccation-induced viable but nonculturable state in <i>Pseudomonas putida</i> KT2440, a survival strategy
<b>Short Title:</b>	Viable but nonculturable state in <i>P. putida</i> KT2440 as a survival strategy
<b>Corresponding Author:</b>	Jesús Muñoz-Rojas, Ph.D. Benemerita Universidad Autonoma de Puebla Puebla, Puebla MEXICO
<b>Keywords:</b>	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440; desiccation; viable but noncultivable; bacterial survival; bacterial inoculants.
<b>Abstract:</b>	The potential of <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 to act as a plant-growth promoter or as a bioremediator of toxic compounds can be affected by desiccation. In the present work, the bacterial survival ratio (BSR) in response to air desiccation was evaluated for <i>P. putida</i> KT2440 in the presence of different protectors. The BSR in the presence of nonreducing disaccharides, such as trehalose, was high after 15 days of desiccation stress (occurring at 30 °C and 50% relative humidity), whereas in the absence of a protector the bacterial counts diminished to nondetectable numbers (ca 2.8 log CFU/mL). The LIVE/DEAD staining method showed that bacteria protected with trehalose maintained increased numbers of green cells after desiccation while cells without protection were all observed to be red. This indicated that nonprotected bacteria had compromised membrane integrity. However, when nonprotected bacteria subjected to 18 days of desiccation stress were rehydrated for a short time with maize root exudates or for 48 h with water (prolonged rehydration), the bacterial counts were as high as that observed for those not subjected to desiccation stress, suggesting that the cells entered the viable but nonculturable (VBNC) state under desiccation and that they returned to a culturable state after those means of rehydration. Interestingly an increase in the green color intensity of cells that returned to a culturable state was observed using LIVE/DEAD staining method, indicating an improvement in their membrane integrity. Cellular activity in the VBNC state was determined. A GFP-tagged <i>P. putida</i> strain expressing GFP constitutively was subjected to desiccation. After 12 days of desiccation, the GFP-tagged strain lost culturability, but it exhibited active GFP expression, which in turn made the cells green. Furthermore, the expression of 16S rRNA, rpoN (housekeeping), mutL, mutS (encoding proteins from the mismatch repair complex), and oprH (encoding an outer membrane protein) were examined by RT-PCR. All evaluated genes were expressed by both types of cells, culturable and nonculturable, indicating active molecular processes during the VBNC state.
<b>Order of Authors:</b>	Laura Abisaí Pazos-Rojas Ligia Catalina Muñoz-Arenas Osvaldo Rodríguez-Andrade Lesther Emanuel López-Cruz Orestes López-Ortega Fábio Lopes-Olivares Silvia Luna-Suarez Antonino Baez Yolanda Elizabeth Morales-García Verónica Quintero-Hernández Miguel Angel Villalobos-López

Powered by Editorial Manager® and Prodxion Manager® from Aries Systems Corporation



## **Desiccation-induced viable but nonculturable state in *Pseudomonas putida* KT2440, a survival strategy**

Laura Abisaí Pazos-Rojas<sup>1,2,3</sup>, Ligia Catalina Muñoz-Arenas<sup>4</sup>, Osvaldo Rodríguez-Andrade<sup>1</sup>, Lester Emanuel López-Cruz<sup>1</sup>, Orestes López-Ortega<sup>5</sup>, Fábio Lopes-Olivares<sup>6</sup>, Silvia Luna-Suarez<sup>2</sup>, Antonino Baez<sup>1</sup>, Yolanda Elizabeth Morales-García<sup>1,3</sup>, Verónica Quintero-Hernández<sup>1,7</sup>, Miguel Angel Villalobos-López<sup>2</sup>, Jesús De la Torre<sup>8</sup>, and Jesús Muñoz-Rojas<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Ecology and Survival of Microorganisms Research Group (ESMRG), Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana (LEMM), Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM), Instituto de Ciencias (IC), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), Puebla, Mexico.

<sup>2</sup>Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional, Tepetitla, Tlaxcala, Mexico.

<sup>3</sup>Licenciatura en Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, BUAP, Puebla, Mexico.

<sup>4</sup>Facultad de Ingeniería Ambiental, Universidad Popular Autónoma de Puebla.

<sup>5</sup>Inserm U932, Institute Curie, 12 rue Lhomond, 75005, Paris, France.

<sup>6</sup>Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para a Agricultura (NUDIBA), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>7</sup>CONACYT, EMSRG, LEMM, CICM, IC, BUAP, Puebla, México.

<sup>8</sup>Department of Environmental Protection, CSIC-Estación Experimental del Zaidín, Granada, Spain.

**Running title:** Viable but nonculturable state in *P. putida* KT2440 as a survival strategy

**\*Corresponding author:** Jesús Muñoz-Rojas, Ph.D., Edificio IC-11, Ciudad Universitaria, San Manuel, Puebla, México. CP 72570. Tel. +222 2295500 ext. 2557. Email:

[joymerre@yahoo.com.mx](mailto:joymerre@yahoo.com.mx)

## Abstract

The potential of *Pseudomonas putida* KT2440 to act as a plant-growth promoter or as a bioremediator of toxic compounds can be affected by desiccation. In the present work, the bacterial survival ratio (BSR) in response to air desiccation was evaluated for *P. putida* KT2440 in the presence of different protectors. The BSR in the presence of nonreducing disaccharides, such as trehalose, was high after 15 days of desiccation stress, whereas in the absence of a protector the bacterial counts diminished to nondetectable numbers. The LIVE/DEAD staining method showed that bacteria protected with trehalose maintained increased numbers of green cells after desiccation while cells without protection were all observed to be red. This indicated that nonprotected bacteria had compromised membrane integrity. However, when nonprotected bacteria subjected to 18 days of desiccation stress were rehydrated for a short time with maize root exudates or for 48 h with water (prolonged rehydration), the bacterial counts were as high as that observed for those not subjected to desiccation stress, suggesting that the cells entered the viable but nonculturable (VBNC) state under desiccation and that they returned to a culturable state after those means of rehydration. Interestingly an increase in the green color intensity of cells that returned to a culturable state was observed using LIVE/DEAD staining method, indicating an improvement in their membrane integrity. Cellular activity in the VBNC state was determined. A GFP-tagged *P. putida* strain expressing GFP constitutively was subjected to desiccation. After 12 days of desiccation, the GFP-tagged strain lost culturability, but it exhibited active GFP expression, which in turn made the cells green. Furthermore, the expression of 16S rRNA, *rpoN* (housekeeping), *mutL*, *mutS* (encoding proteins from the mismatch repair complex), and *oprH* (encoding an outer

membrane protein) were examined by RT-PCR. All evaluated genes were expressed by both types of cells, culturable and nonculturable, indicating active molecular processes during the VBNC state.

## Introduction

*Pseudomonas putida* KT2440 is a nonpathogenic gram-negative bacterium that is able to colonize the rhizosphere of several plants [1], degrade aromatic compounds [2,3], and promote the growth and health of plants [4–6]. *P. putida* KT2440 has been widely used as a model in biodegradation and environmental adaptation studies [7,8], showing complex chemosensory systems, signal transduction, genetic regulation, and environmental stress responses that explain its high metabolic and adaptive versatility [7,9–11]. Despite this versatility, the survival of *P. putida* KT2440 decreases drastically after the loss of water, as documented in studies of freeze-drying and drying, both under vacuum conditions [12,13]. The potential of *P. putida* KT2440 for use in the bioremediation of soils and plant growth promotion could be affected by drought, temperature and pH fluctuations, high salinity, low nutrient availability, and desiccation. These conditions are limiting factors that determine the survival of all bacteria [14–17]. In particular, desiccation is a highly restrictive factor in regard to the development of any organism, including bacteria [17–19]. Some bacteria are highly tolerant to desiccation, such as *Enterobacter* sp. UAPS03001, *Klebsiella variicola* T29A and *Paraburkholderia unamae* MTI-641, but others are very sensitive to desiccation stress, such as *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 and *Burkholderia sacchari* LMG 19450 [6,20,21]. Under water-limited conditions, tolerance to desiccation is fundamental for any bacterial species associated with seeds to maintain their plant-growth promoting features, which normally recover after rehydration [20]. The bacteria that are best adapted to desiccation-

rehydration processes will be the most competitive in environments with low water availability; for example, tolerant bacteria that were adhered to seeds and desiccated for 18 days were rehydrated and showed good root colonization during plant development [6]. In addition, bacteria tolerant to desiccation have the capability to rapidly resume activity and show increased transcription levels when water becomes available again [22].

The presence of stressors such as UV radiation, heavy metals, nutrient limitation, low temperatures, salinity, desiccation and oxidation can lead to a viable but nonculturable (VBNC) state [23–26], in which bacteria remain viable and metabolically active but fail to grow on standard culture media [27,28]. Cells suffer metabolic changes, such as a reduction in nutrient transport, respiration rates, and macromolecular synthesis, during the VBNC state [29]. Furthermore, a continuous gene expression occurs in cells in VBNC state [30], which has been proposed to be definitive proof that cells remain metabolically active and are not dead [23]. In some cases, the removal of the inducing stressors and/or the provision of suitable conditions for VBNC cells can restore their ability to grow and therefore their culturability [31,32]. At least eighty-five bacterial species have been reported to enter the VBNC state, most of them pathogenic species [32], but the behavior of beneficial plant-associated microorganisms remains to be fully investigated.

Bacterial desiccation under vacuum conditions is completely different from that occurring in natural environments because desiccation in the environment occurs without negative pressure. Air desiccation studies could better represent the level of tolerance of microorganisms, and their beneficial potential could be affected by water limitation. Therefore, in the present work, the capability of *P. putida* KT2440 to tolerate air desiccation was studied, and its entrance into a VBNC state as a survival strategy is discussed.

## Materials and methods

### Bacterial growth and desiccation assays

*P. putida* KT2440 cells were grown until the stationary phase in LB (Luria-Bertani) liquid medium supplemented with 100 µg/mL chloramphenicol (LB-Cm<sup>100</sup>) [12]. Desiccation assays were conducted as previously described [33]. Three hundred and sixty milliliters of bacterial growth suspension was subdivided into aliquots of 15 mL. Each aliquot was centrifuged at 5000 rpm for 10 min, the supernatant was removed and the pellet was resuspended in the same volume of sterile distilled water. This process was repeated twice but in the second round the bacterial pellet in each tube was resuspended with 200 mM of different protectors. A control using only water was included (Table 2). Each suspension was aliquoted in microtubes of 1.5 mL capacity with 500 µL of bacterial suspension and covered with sterile cotton. Five samples from each treatment were used to determine the bacterial density (Colony Forming Units (CFU)/mL) contained in the suspensions before desiccation using the Massive Stamping Drop Plate (MSDP) method [34–36]. Desiccation was carried out at 30 °C and 50% relative humidity (RH). The bacterial density (CFU/mL) was monitored every 3 days after the beginning of desiccation (DABD) by taking 5 samples and rehydrating them with water (500 µl) for 20 min. The medium used for bacterial quantification was LB agar (1.5% W/V)-Cm<sup>100</sup>. The BSR to air desiccation was calculated as the ratio of the log of the number of bacterial cells present in the suspension at any time post desiccation (PD) plus one to the log number of viable cells before desiccation (BD), all multiplied by 100;  $BSR = [(\log PD + 1)/\log BD] \times 100$  [6,12,20]. A BSR value of 100 indicates that all bacteria survived after desiccation stress, while a BSR value of 0 indicates that no bacteria survived. Samples were weighed both before desiccation and after desiccation to calculate the water lost from each sample. All samples attained complete desiccation at 5 DABD.

## **Adherence to maize sprouts and colonization of *P. putida* KT2440 after desiccation**

Cells of *P. putida* KT2440 were desiccated with or without a protector (trehalose 200 mM) following the methodology described above. At 18 DABD, a total of 25 dried samples with and without the protector were rehydrated with water (500  $\mu$ L) for 20 min and transferred to a Falcon 15 mL centrifuge tube. Axenic maize sprouts were obtained according to Morales-García *et al.* (2011) [37] and then inoculated by submerging the germinate in the bacterial suspension for 1 h. Two control treatments were included, the first consisting of 20 sprouting seeds submerged in water for 1 h and the second consisting of 20 sprouting seeds submerged in 200 mM trehalose. Five sprouts from each treatment were used to determine the number of bacteria adhered to the maize germinates using the MSDP method [6,20,37]. The remaining sprouts were transferred to 50 mL Falcon centrifuge tubes containing 6.4 g of sterile vermiculite amended with 25 mL of sterile water, and the tubes were placed in a plant growth chamber for 15 days at 25 °C and 80% RH with a photoperiod of 16 h light/8 h darkness. Every 3 days, the plants were irrigated to maintain substrate moisture. Rhizosphere samples were collected to evaluate colonization as previously described using five replicate plants from each treatment [20,36,38]. For this, the vermiculite adhered to the roots and considered as the rhizosphere was resuspended in water at a ratio of 1:10 (W/V). This suspension was vortexed for 3 min, and the resulting suspension was serially diluted. The bacterial abundance was determined according to the MSDP method using LB-agar (1.5% W/V)-Cm<sup>100</sup>. In addition to colonization, the bacterial membrane integrity was evaluated for each treatment (with and without trehalose) at each stage of bacterial establishment. Thus, suspensions of the bacteria before desiccation, at 18 DABD and rehydrated for 20 min, bacterial suspensions from sprouting

seeds and from the rhizosphere were assayed. For all the evaluated samples, the MFI (mean of fluorescence intensity) values were calculated. Both the membrane integrity assays and MFI measurements are described in the section “Membrane damage to *P. putida* KT2440 during desiccation”.

## **Rehydration of *P. putida* KT2440 with maize root exudates**

Two types of root exudates were obtained: 1) Root exudates from the early stages of growth. For this treatment, five mL of water was used to wash an agar-water plate in which 10 axenic seeds had previously germinated [37]. The collected exudates were stored at -20 °C until they were used. 2) Root exudates from plants grown for 12 days. This type of root exudate was obtained from hydroponic axenic systems. Each system consisted of a 300 mL flask containing 100 mL of liquid MS-J medium (Morales-García *et al.*, 2011). A metallic ring was placed inside each flask in contact with the medium, and the systems were covered with cotton. The hydroponic systems were sterilized before use. A previously germinated axenic maize sprout was placed in each ring such that the root remained in contact with the MS-J medium, and the root exudates were allowed to accumulate within the medium. The plant growth conditions were 25 °C and 80% RH with a photoperiod of 16 h light/8 h darkness. The root exudates were collected after 12 days of plant growth and were stored at -20 °C until they were used.

Both types of root exudates were used to rehydrate desiccated cells of *P. putida* KT2440. Desiccated bacterial cells were obtained as described before, and 5 samples were prepared for each treatment. The bacterial abundances in the suspensions before desiccation and at 18 DABD were determined using the MSDP method with five independent samples for each treatment. The

desiccated cells were rehydrated for 20 min and 3, 6, 9, 12, 24, 27, 30 and 48 h with the plant root exudates. Cells rehydrated only with water were used as controls.

## **Ability of *P. putida* KT2440 to grow in the presence of maize root exudates under static conditions**

To test whether *P. putida* KT2440 can use maize root exudates as a carbon source and grow under static conditions, similar to the procedure used in the rehydration experiments, bacterial cells were grown until the stationary phase in liquid LB-Cm<sup>100</sup> medium (two 50 mL flasks containing 15 mL of culture). The bacterial suspensions were washed and resuspended with the same volume of maize root exudates and water as a control. The suspensions were serially diluted (1:10) to quantify the number of bacteria. For the exudate treatments, the bacterial dilutions were performed using the exudates. All dilution tubes were kept at room temperature under static conditions for 24 and 48 h. The bacterial abundance in each dilution was determined at those experimental times.

## **Membrane damage to *P. putida* KT2440 during desiccation**

Bacterial membrane damage was evaluated using the L7007 LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kit for microscopy (Molecular Probes Invitrogen Detection Technologies) and the observation of stained cells using fluorescence microscopy. This kit uses SYTO<sup>®</sup> 9 and propidium iodide to discriminate between live cells with intact membranes (green fluorescence) and dead cells with compromised membranes (red fluorescence). Cells of *P. putida* KT2240 were grown until the stationary phase, and samples of washed bacterial suspension were desiccated for 18 days following the methodology described previously. Membrane integrity was tested in 5 samples before desiccation, and in five samples from 3, 6, 9, 12, 15 and 18 DABD rehydrated for 20 min,



and the bacterial abundances were determined to calculate the BSR values. The cells at 18 DABD were also rehydrated for 24 and 48 h to determine the bacterial abundance and membrane integrity. The samples were observed with the VE-146YT fluorescence microscope at 100× using G (excitation 500-550 nm, red bacteria) and B filters (excitation 420-490 nm, green bacteria) following the supplier's instructions. The bacterial images were examined by means of fluorescence intensity (MFI) graphs to evaluate the distribution of propidium iodide and SYTO<sup>®</sup> 9 alone or in combination (MERGE); the analysis was performed along a line randomly traced through the cells. Pixel intensity information per fluorescence channel was extracted with ImageJ (v1.43u, NIH, USA, public domain). Each graph was generated from a minimum of fifteen randomly selected bacteria for each condition per experiment using Microsoft<sup>®</sup> Excel<sup>®</sup> (v14.3.9, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). The MFI data were examined sequentially by ImageJ and graphed using Prism software.

### **TEM analysis of *P. putida* KT2440 under desiccation**

TEM analysis was performed with the BD samples and those from 6, 12 and 18 DABD. The methodology used to prepare the samples was carried out in four stages: 1) fixation of the sample with a mixture of 2.5% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde and 0.05 M phosphate buffer; 2) sample washing with phosphate buffer; 3) sample dehydration with alcohol at different concentrations (15, 30, 50, 70, 90 and 100%), starting the wash from the lowest to the highest concentration of alcohol; and 4) inclusion of the sample in LR White (Sigma) starting with a dilution of 2:1 (alcohol:resin) for 6 h at 4 °C. Subsequently, the solution was discarded, and a dilution of 1:1 (alcohol:resin) was added under the same conditions. Finally, the solution was discarded, pure resin was added for 24 h at 4 °C (two times) and the samples were allowed to

polymerize at 60 °C for 24 h. After inclusion, the samples were microtomed for the analysis of contrast, and the samples were observed with TEM.

## **Desiccation of *P. putida* KT2440 tagged with GFP**

GFP-tagged *P. putida* KT2440, generated by the site-specific insertion of miniTn7-*gfp* at an extragenic location near *glmS*, which constitutively expresses the *gfp* gene [39], was used in this work. The GFP-tagged bacterial strain was subjected to desiccation for 18 days following the methodology described above. The bacterial abundance was determined at 3, 6, 9, 12, 15 and 18 DABD after rehydration, and BSR values were calculated. The microscopic examination of GFP fluorescence using a Zeiss Axioplan ZE155 microscope (Germany) (filters BP546/ FT580/ LP590) was performed with the same samples used to quantify the bacterial abundance, and the fluorescence intensity was measured with a HIDEX Chameleon Multilabel Detection Platform multiwell plate reader at an excitation wavelength of 395 nm and emission wavelength of 509 nm. The samples were observed at 100×.

## **Expression of some constitutive genes of *P. putida* KT2440 under desiccation**

Total RNA was extracted from *P. putida* KT2440 cells before desiccation, and from 20 min-rehydrated cells (from samples at 6, 12 and 18 DABD). RNA extraction was performed using the hot acidic phenol-chloroform method (3 replicates of 1.5 mL) [40]. Cells were lysed using 0.5% SDS, 20 mM sodium acetate and 10 mM EDTA, and RNA was extracted twice with hot acid phenol:chloroform followed by two extractions with phenol:chloroform isoamyl alcohol. Total RNA was precipitated with absolute ethanol and then washed in 70% ethanol (molecular grade).

Finally, the RNA sample was resuspended in DEPC water and stored at -80 °C until use. To reduce genomic DNA contamination, the RNA isolated from each sample was treated with the Invitrogen™ TURBO DNA-free Kit. RNA integrity was evaluated in 2% agarose gel, and its concentration was measured using a Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000/2000c spectrophotometer. The cDNA of each gene for which expression was evaluated was obtained using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit from Applied Biosystems, with 2 µg RNA as the template and 10 µM of specific DNA primers (antisense primers, Table 1). Retrotranscription reactions were performed at 25 °C per 10 min, 37 °C per 120 min, 85 °C per 5 min, and 4 °C per 10 min. Total cDNA was quantified using a Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000/2000c spectrophotometer. To amplify each gene of interest from the cDNA obtained, PCRs were performed. The PCR conditions were 1 cycle for 5 min at 95 °C, 25 cycles at 95 °C for 30 seconds, 63 °C for 30 seconds, and 72 °C for 20 seconds, 1 cycle at 72 °C for 8 min, and a final step of 10 min at 4 °C. The amplified products were visualized by electrophoresis in 1% agarose gel (30 min, 100 volts) using GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium).

**Table 1. Oligonucleotides used for the analysis by RT-PCR and RT-qPCR**

Gene	Product	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
<i>oprH</i>	Outer membrane porine	GCCGCTACTACATGACCTATG	CCGAACAGCTTGGTGGTAT
<i>mutL</i>	DNA mismatch repair system	GCAGCTCAAGGGTATCTACATC	CTTGAGGCGCTCGTACATTAT
<i>mutS</i>	DNA mismatch repair system	CACCCACTACTTCGAACTGAC	GGAACACGATGCGTTCATTG
16S RNA	16S RNA	TGTGAAGAAGGTCTTCGGATTG	CAGAGTTAGCCGGTGCTTATT
<i>rpoN</i>	Sigma factor $\sigma_{54}$	CTGGTAGAACTGAACCAGGAAG	GTTGCGCATGAAGGTGTTG

Real-time qPCR was performed using an Applied Biosystems™ 7500 Fast Real Time PCR System. Reactions were performed by using SYBR Green PCR Master Mix as a signal reporter and 30 amplification cycles. Each reaction was composed of 10 ng of cDNA and 6 μM of sense and antisense primers in a total volume of 20 μL. RT-qPCR was performed in 96-well microtiter PCR plates using the following amplification conditions: 1 cycle of 5 min at 95 °C and 30 two-step cycles at 95 °C for 30 seconds and 63 °C for 30 seconds. Each reaction was performed in triplicate. Data were analyzed using the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method [41]. In our work,  $\Delta\Delta C_T = [(C_T \text{ gene of interest} - C_T \text{ internal control}) AD - (C_T \text{ gene of interest} - C_T \text{ internal control}) BD]$ , where AD means after desiccation and BD means before desiccation. The expression of the *rpoN* gene was used as an endogenous control to normalize the amount of mRNA obtained from a target gene. The expression data obtained for each time point were normalized to the expression of each gene obtained before desiccation.

## Results

### **Survival of *P. putida* KT2440 under air desiccation (30 °C and 50% RH) was increased by nonreducing disaccharides.**

The tolerance of *P. putida* KT2440 to air desiccation was explored in the presence or absence of 200 mM of diverse substances used as possible protectors (Table 2). *P. putida* KT2440 was sensitive to desiccation, and bacteria were not detected at 12 DABD after rehydration when no protector was added. Some of the explored compounds protected this bacterium from desiccation stress (Table 2). The best protectors were the nonreducing disaccharides (trehalose and sucrose) and the monosaccharide glucose, followed by fructose and some polyalcohols (dulcitol, mannitol

and myo-inositol). Other compounds were less successful in protecting this bacterium, such as maltose, lactose and adonitol. Galactose was unable to protect *P. putida* KT2440 from desiccation, and the BSR was similar to that observed without protector addition. The presence of amino acids had a negative effect on bacterial survival under the evaluated desiccation conditions in comparison with that in the absence of a protector.

**Table 2. BSR of *P. putida* KT2440 cells subjected to air desiccation in the presence or absence of protectors (200 mM)**

	0 DABD	3 DABD	6 DABD	9 DABD	12 DABD	15 DABD
Trehalose	100	100.79 (± 2.75)	86.66 (± 3.83)	82.89 (± 1.5)	78.65 (± 4.41)	79.56 (± 2.79)
Sucrose	100	96.67 (±1.88)	88.77 (± 1.11)	75.99 (± 6.61)	77.05 (± 5.10)	79.05 (± 5.10)
Glucose	100	84.78 (± 1.32)	85.62 (± 1.13)	84.36 (± 2.55)	84.13 (± 1.19)	80.84 (± 0.82)
fructose	100	74.62 (± 3.92)	73.83 (± 1.51)	73.12 (± 4.74)	71.05 (± 4.59)	65.793 (± 6.05)
Dulcitol	100	97.65 (± 0.58)	80.00 (± 2.35)	68.89 (± 8.08)	63.65 (± 4.31)	55.31 (± 9.01)
Mannitol	100	97.34 (± 1.15)	80.33 (± 0.69)	68.61 (± 2.61)	53.59 (± 5.54)	50.26 (± 6.98)
Myo-Inositol	100	99.57 (± 0.94)	80.76 (± 3.83)	74.92 (± 3.32)	55.70 (± 6.93)	47.56 (± 4.3)
Raffinose	100	78.86 (± 8.39)	69.37 (± 4.32)	55.43 (± 1.11)	54.10(± 3.79)	47.54 (± 3.79)
Sodium gluconate	100	87.41 (± 4.25)	52.04 (± 4.09)	42.34 (± 5.16)	44.20 (± 5.56)	35.15 (± 5.46)
Arabinose	100	58.13 (± 10.51)	26.91 (± 8.91)	36.60 (± 9.40)	17.78 (± 8.40)	20.06 (± 8.86)
Maltose	100	92.00 (± 3.25)	14.36 (± 14.37)	20.76 (± 4.82)	15.73 (± 4.81)	9.99 (± 5.33)
Xylose	100	70.34 (± 1.65)	62.25 (± 1.66)	53.84 (± 3.99)	43.21 (± 6.35)	17.44 (± 6.10)
Lactose	100	49.40 (± 9.95)	30.71 (± 6.98)	30.84 (± 6.42)	16.09 (± 5.71)	10.18 (± 5.04)
Adonitol	100	99.22 (± 1.45)	73.88 (± 8.09)	12.98 (± 8.02)	16.23 (± 5.04)	4.43 (± 5.91)
Water	100	88.42 (± 7.09)	50.16 (± 8.1)	21.47 (± 9.68)	0	0
Galactose	100	7.531 (± 16.84)	5.78 (± 12.92)	12.88 (± 8.9)	0	0
Tyrosine	100	94.58 (± 0.61)	31.74 (± 4.97)	0	0	0
Glycine	100	89.79 (± 0.96)	16.67 (± 9.49)	0	0	0
Proline	100	97.67 (± 2.61)	0	0	0	0
Methionine	100	88.16	0	0	0	0

		(± 1.56)				
Ornithine	100	85.60 (± 2.62)	0	0	0	0
Sodium deoxycholate	100	80.33 (± 5.04)	0	0	0	0
Cystein	100	0	0	0	0	0

## **Desiccation of *P. putida* KT2440, its adherence to maize seeds after rehydration, and its capability to colonize the rhizosphere.**

The BSR of *P. putida* KT2440 decreased to an undetectable level after 9 DABD without a protector, but in the presence of trehalose as a protector, the bacterial abundance was approximately  $10^8$  CFU/mL for all experimented time points (Fig. 1). In this experiment, bacterial viability was evaluated in a suspension before desiccation and at 18 DABD using the LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit. Before desiccation, the observed cells were green in both conditions, with and without trehalose (Figs. 2A and 2B). However, at 18 DABD, the protected suspension contained green bacterial cells, and the nonprotected suspension contained only red bacterial cells (Figs. 2C and 2D). Red cells lack an intact cell membrane and are conventionally scored as dead. At 18 DABD, the rehydrated samples were used to inoculate maize sprouts for 1 h. The number of bacteria in the suspensions did not change after interaction with sprouts (high numbers of bacteria in the presence of the protector and no detected bacteria in the absence of the protector). The sprouts were transferred to Falcon tubes containing 6.4 g of vermiculite, and 25 mL of water was added. The adherence of the bacteria was tested 2 h after sowing, and the bacterial abundance was  $9.1 \times 10^6$  CFU/sprouted seed in the treatment with trehalose, while bacteria were not detected in the treatment without a protector. Membrane integrity was tested with the LIVE/DEAD Kit, and several bacterial cells were observed to be green in the trehalose treatments (Fig. 2E), while the nonprotected cells were all red (Fig. 2F). Rhizosphere colonization by *P. putida* KT2440 was tested

at 15 days post inoculation (dpi). Surprisingly, *P. putida* KT2440 colonized the rhizosphere of the plants in high numbers in both treatments:  $4 \times 10^8$  CFU/gV for the treatment with trehalose and  $9 \times 10^8$  CFU/gV for the treatment without a protector (Fig. 3A). The recuperation of bacterial cells in the rhizosphere of plants derived from seeds on which bacteria were not detected after desiccation could mean that the bacteria entered a viable but nonculturable state during the desiccation process (treatment without the use of protectors) and had returned to a culturable state when the bacteria interacted with the plants. The membrane integrity of the bacteria colonizing the plant rhizosphere was evaluated, and all observed bacteria were green in both treatments, suggesting that the membranes of the cells, from the treatment without protection were recovered in terms of their integrity and that the crossing of propidium iodide was prevented during their interaction with the plants (Figs. 3B and 3C). The MFI analysis corroborated the observations of membrane integrity restoration after bacterial colonization because the MFI of SYTO<sup>®</sup> 9 increased with respect to that of propidium iodide both in the presence and absence of the protector (Figs. 4 and 5).

**Figure 1. Bacterial survival ratio (A) and log CFU/mL (B) of *P. putida* KT2440 under desiccation stress (30 °C and 50% RH). DABD means days after the beginning of desiccation.**

**Figure 2. Fluorescence micrographs of *P. putida* KT2440 cells treated with the LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kit.** (A) Bacterial cells before desiccation with trehalose (200 mM). (B) Bacterial cells before desiccation without a protector. (C) Bacterial cells protected with trehalose at 18 DABD. (D) Bacterial cells without a protector at 18 DABD. (E) Bacterial cells protected with trehalose adhered to germinated seeds after rehydration. (F) Bacterial cells without protection adhered to germinated seeds after rehydration. The samples were observed at 100 $\times$ . Each image represents the MERGE of two captured images (green and red cells). The generation of

MERGE images is shown in Figs. S1 and S3, and examples of MERGE cell analysis are shown in Figs. S2 and S4.

**Figure 3. Rhizosphere colonization by *P. putida* KT2440.** (A) Cell abundance from plants inoculated with rehydrated 18 DABD cells without protection in comparison to cell abundance from plants inoculated with rehydrated DABD cells in the presence of trehalose (200 mM). (B and C) Fluorescence micrographs of *P. putida* KT2440 using the LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kit. The samples were observed at 100 $\times$ . (B) Cells obtained from the rhizosphere of plants inoculated with rehydrated 18 DABD cells without protection. (C) Bacterial cells obtained from the rhizosphere of plants inoculated with rehydrated 18 DABD cells in the presence of trehalose (200 mM). Each image represents the MERGE of two captured images (green and red cells). The generation of MERGE images is shown in Figs. S1D and S3D, and examples of the analysis of cells in MERGE images are shown in Figs. S2D and S4D.

**Figure 4. Mean fluorescence intensity (MFI) of *P. putida* KT2440 cells with protection (trehalose 200 mM).** (A) Analysis of SYTO<sup>®</sup> 9 and (B) analysis of propidium iodide. (1) Samples obtained from the bacterial suspension before desiccation, (2) cells at 18 DABD rehydrated for 20 min, (3) cells adhered to maize sprouts, and (4) cells from rhizosphere colonization.

**Figure 5. Mean fluorescence intensity (MFI) of *P. putida* KT2440 cells without protection.** (A) Analysis of SYTO<sup>®</sup> 9 and (B) analysis of propidium iodide. (1) Samples obtained from the bacterial suspension before desiccation, (2) cells at 18 DABD rehydrated for 20 min, (3) cells adhered to maize sprouts, and (4) cells from rhizosphere colonization.



## **Desiccated nonculturable *P. putida* KT2440 returns to a culturable state after rehydration with plant exudates or under prolonged rehydration**

To explore whether the exudates of plants return *P. putida* KT2440 to a culturable state, cells in the stationary phase were desiccated until 18 DABD and rehydrated three different suspensions: 1) maize sprout exudates, 2) maize root exudates following 12 days of growth, and 3) water only as a control. Rehydration was carried out for 20 min and 1, 3, 6, 9, 12, 24, 27, 30 and 48 h, and the bacterial abundance was determined. As expected, the bacterial abundance had decreased to nondetectable levels at 18 DABD, but the bacteria returned to a culturable state after rehydration with plant root exudates or with only water; interestingly, this return was faster in the presence of exudates; in contrast, in water, the bacterial abundance was similar to that of the samples rehydrated with the exudates for up to 48 h (Table 3). It is noteworthy that the plant root exudates obtained from the early stages were able to accelerate the return to a culturable state of the *P. putida* KT2440 cells (Table 3). During rehydration, the bacterial suspension in the microtubes remained static, and independent experiments showed that the bacterial cells were unable to duplicate under this condition in the presence of both exudates and only water (Fig. 6). Therefore, the increase in *P. putida* KT2440 observed after the rehydration of desiccated cells corresponds to cells returning to a culturable state but not to active growth under static rehydration. Because the bacteria returning to a culturable state reached levels of cultivability similar to that observed for the bacteria rehydrated with the plant root exudates, later experiments were conducted under prolonged water rehydration.

**Table 3. Number of cells of *P. putida* KT2440 (log CFU/mL) 18 DABD and rehydrated with root exudates of maize.**

Maize root exudates	Time of rehydration								
	20 min	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h	27 h	30 h	48 h
Maize sprout	0	0	0	0	3.09 ±0.15	4.81 ±0.19	6.09 ±0.14	6.21 ±0.10	7.11 ±0.19
12 days of growth of plant	0	0	0	0	3.21 ±0.41	4.78 ±0.26	6.14 ±0.29	6.62 ±0.09	7.32 ±0.23
Water control	0	0	0	0	0	4.34 ±0.16	5.46 ±0.29	5.34 ±0.16	7.39 ±0.36

**Figure 6. Bacterial behavior of *P. putida* KT2440 cells rehydrated with water (orange line) or in the presence of root exudates (blue line) under static conditions for 48 h.**

### **Evaluating the membrane integrity of *P. putida* KT2440 after desiccation and rehydration**

Bacterial membrane damage caused during desiccation and rehydration was related to bacterial viability and cultivability. *P. putida* KT2440 was desiccated at 30 °C and 50% RH until 18 DABD, and every 3 days, the number of culturable bacteria and membrane integrity were evaluated. Before desiccation, the bacterial abundance was approximately  $4.5 \times 10^8$  CFU/mL, with a BSR of 100 (Fig. 7H), and the majority of the observed cells were green when the LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit was used, indicating the presence of healthy membranes (Figs. 7A, S5A and S6A). The BSR decreased to 0 at 12 DABD (Fig. 7H), and the number of green bacteria decreased with a concomitant increase in red bacteria (Fig. 7), in accordance with the MFI analysis (Fig. 8). This result indicates that the bacterial membrane is damaged during desiccation stress, which is associated with the inability of the bacteria to grow in the culture media after a short rehydration period. At 18 DABD, the samples were rehydrated for 24 and 48 h, and an increase in the number of culturable bacterial cells to  $2.3 \times 10^4$  and  $3.2 \times 10^7$  CFU/mL, respectively, was observed, with a similar increase in the number of green bacterial cells, which indicated that membrane repair had occurred (Figs. 9, S7 and S8). The increase in green intensity was supported by the MFI values

(Fig. 10A); interestingly, the MFI values associated with propidium iodide were similar to those found under rehydration (Fig. 10B). Bacterial staining using toluidine blue showed a decrease in bacterial size among the desiccated bacteria (Fig. S9). TEM observation of the bacterial cells during desiccation showed that the bacteria suffered a retraction of the cell cytoplasm with a concomitant increase of periplasmic space (Fig. 11).

**Figure 7. Fluorescence of *P. putida* KT2440 cells desiccated for 18 days and stained with the LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit.** (A) Cells before desiccation and (B) 3, (C) 6, (D) 9, (E) 12, (F) 15, and (G) 18 DABD. Each image represents the MERGE of two captured images (green and red cells). The samples were observed at 100×. The generation of MERGE images is shown in Fig. S5, and examples of the analysis of MERGE images are shown in Fig. S6. (H) The BSR of *P. putida* KT2440 during desiccation.

**Figure 8. Mean fluorescence intensity (MFI) of the same images as in Fig. 7.** (A) Analysis of SYTO® 9. (B) Analysis of propidium iodide.

**Figure 9. Fluorescence of *P. putida* KT2440 cells desiccated for 18 days and stained with the LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit.** (A) Cells before desiccation, (B) cells at 18 DABD rehydrated for 20 min, (C) cells at 18 DABD rehydrated for 24 h, (D) cells at 18 DABD rehydrated for 48 h. The samples were observed at 100×. Each image represents the MERGE of two captured images (green and red cells). Generation of MERGE images is shown in Fig. S7, and examples of analysis of MERGE images are shown in Fig. S8.

**Figure 10. Mean fluorescence intensity (MFI) of the same images as in Fig. 9.** (A) Analysis of SYTO® 9. (B) Analysis of propidium iodide.

**Figure 11. Transmission electron microscopy of *P. putida* KT2440.** (A) Before desiccation, 50,000 $\times$ , (B) at 6 DABD, 30,000 $\times$ , (C) at 12 DABD, 30,000 $\times$  and (D) at 18 DABD, 50,000 $\times$ .

### **Desiccation of *P. putida* KT2440::*gfp* (green fluorescent protein)**

A miniTn7-GFP mutant strain of *P. putida* KT2440, which constitutively expresses the green fluorescent protein [39], was used to explore whether this protein is expressed by bacterial cells after desiccation. The desiccation tolerance of *P. putida* KT2440::*gfp* was similar to that of the wild-type strain; this strain was nonculturable at 12 DABD (Fig. 12H), but under fluorescence microscopy, cells of *P. putida* tagged with GFP were green during different stages of desiccation (Fig. 12), indicating constitutive expression and active synthesis of this protein. However, the fluorescence intensity of the desiccated bacterial cells partially decreased until 18 DABD (Fig. 12H).

**Figure 12. Fluorescence of *P. putida* KT2440 tagged with GFP desiccated for 18 days.** (A) Cells before desiccation and (B) 3, (C) 6, (D) 9, (E) 12, (F) 15, and (G) 18 DABD. The samples were observed at 100 $\times$ . (H) The BSR of *P. putida* tagged with GFP during desiccation (blue line) and fluorescence intensity of *P. putida* tagged with GFP during desiccation (orange line).

### **Bacterial gene expression of some constitutive genes before and after desiccation and rehydration**

RNA was extracted from nondesiccated and desiccated-rehydrated cells to evaluate the active expression of genes from culturable and nonculturable cells. Desiccated cells from 18 DABD and, in some cases, 40 DABD were rehydrated for 20 min or 24 h. The explored genes were 16S rRNA, *rpoN* (housekeeping), *mutL*, *mutS* (codifying proteins from the mismatch repair complex), and a gene codifying an outer membrane protein widely distributed in *P. putida* KT2440 (*oprH*). All

evaluated genes were expressed by cells both before desiccation and after desiccation-rehydration independent of the time of desiccation or rehydration (Figs. S10 and S11), which means that the desiccated-rehydrated cells were alive at all evaluation times, even though they had membrane damage or were nonculturable.

The level of expression of the *mutL*, *mutS* y *oprH* genes from *P. putida* KT2440 was quantified before desiccation and at 6, 12 and 18 DABD with the RT-qPCR method. Interestingly, *oprH* gene expression was markedly increased at 6 DABD (19.37 times), and the expression declined at 12 or 18 DABD (Fig. 13), but it was higher than the levels observed before desiccation. The level of expression of the *mutS* gene increased more than 2 times at 6 and 12 DABD and returned to levels similar to those of nondesiccated cells at 18 DABD. The level of expression of the *mutL* gene was constant, but it decreased at 18 DABD.

**Figure 13. Gene expression levels of *mutL* (blue bar), *mutS* (orange bar) and *oprH* (gray bar) obtained by RT-qPCR. Before desiccation (0) and 6, 12 and 18 DABD.**

## Discussion

*P. putida* KT2440 has high agro-biotechnological potential [4,6,42]. According to our results, this bacterium is very sensitive to air desiccation, and the benefits of a sensitive bacterial species could be lost after desiccation occurs in the environment [20,21]. Bacterial tolerance to desiccation is a key factor in designing stable inoculants because tolerant bacteria can adhere to seeds, tolerate desiccation in field soils, and colonize plant roots after rehydration when environmental conditions are favorable, maintaining their ability to improve plant growth [6,20]. Therefore, the high tolerance of *P. putida* KT2440 and studies about how this bacterium tolerates desiccation are very important to exploit its capabilities in fields. Disaccharides have been reported to be good protectors of *P. putida* KT2440 under freeze-drying conditions [12,13]. However, in our work,

only nonreducing disaccharides were able to effectively protect *P. putida* KT2440 cells from the effects of air desiccation. The best protector was trehalose, resulting in high cultivability in this bacterium, and this disaccharide could be used to formulate bacterial powder inoculants. Although trehalose produced by genetically modified cells of *P. putida* KT2440 was unable to protect the cells from the effects of freeze-drying [13], this disaccharide was shown to be able to protect *P. putida* KT2440 from the effects of the freeze-drying process when this sugar was added at 200 mM [12], as was also observed in terms of protection against air desiccation in our work.

Trehalose facilitated high bacterial culturability even at 18 DABD; however, in the treatments without protection, the number of culturable cells decreased to a nondetectable value after 12 DABD. Therefore, we hypothesize that only rehydrated protected cells can adhere to roots and colonize the rhizosphere of maize plants. As expected, only protected cells were detected in the adhesion assays. Surprisingly, the number of bacteria colonizing the rhizosphere of maize plants was similarly high in the protected and nonprotected cell treatments. We propose that during desiccation, *P. putida* KT2440 enters a nonculturable state as a strategy to cope with stress. However, the bacterial cells return to a culturable state after interacting with plant roots, likely because the exudates of plants activate mechanisms related to this return. To determine whether root exudates allow *P. putida* KT2440 to return to cultivability, the bacterial cells were desiccated until 18 DABD, and they were rehydrated with only water or with maize root exudates; *P. putida* KT2440 cells returned to a culturable state after rehydration with plant root exudates faster than they did with only water, suggesting that some compounds or molecules from exudates favor the return to a culturable state. Studies have shown that when *Bacillus atrophaeus* UCMB-5137 grows in the presence of corn exudates, the expression of genes related to stress and detoxification is stimulated [43]; it is probable that the maize root exudates favor the expression of genes necessary for the return to a culturable state for *P. putida* KT2440 after rehydration. Among the compounds

present in the exudates of corn plants are nitrogen compounds, fatty acids, organic acids, sugars, volatile compounds, steroids, terpenoids and other substances [44,45]. It will be interesting to carry out future trials to clarify which compounds favor the quickest return to a culturable state in *P. putida* KT2440 following the rehydration of desiccated cells. The return to a culturable state occurs when bacteria find favorable conditions and when the stress is completely withdrawn [25], and this could explain why in our work bacterial cells were also able to return to a culturable state after prolonged rehydration.

Bacteria in the VBNC state can be identified using techniques that determine whether they are metabolically active even if they are not culturable. These methodologies include assays with the LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kit, which identifies damage to the plasmatic membrane [25], studies of the green fluorescent protein (GFP), which is constitutively expressed by nonculturable bacteria [30,46], and gene expression studies using molecular tools, such as RT-PCR and RT-qPCR [23,47]. In the present work, we used these techniques to evaluate whether *P. putida* KT2440 remain active in the VBNC state during desiccation. By using the LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kit, it was observed that there was an increase in the number of red bacteria and that the propidium iodide MFI values were greater than the MFI values of SYTO<sup>®</sup> 9, indicating that the injury to membranes of *P. putida* KT2440 increases as the duration of desiccation progresses. During desiccation, bacterial membrane changes in the composition of fatty acids and experience alterations in its fluidity [48], and destabilization could allow propidium iodide to cross the membrane and the red staining of cells. According to the kit and other works, red cells are considered dead [49]. However, our results showed that the red bacterial cells from 18 DABD (after rapid rehydration) were nonculturable, but they returned to a culturable state after prolonged rehydration or rehydration in the presence of exudates, indicating that the red cells never died.

Interestingly, under prolonged rehydration (24 and 48 h), the bacteria decreased in terms of the intensity of their red coloration, as indicated by the microscopic analysis and MFI values, and increased in terms of the intensity of their green coloration. This result indicates that the penetration of the bacterial cells by propidium iodide decreased, likely due to the recovery of membrane integrity, and again, that the crossing of propidium iodide was prevented. In fact, in association with plants, the red intensity declined, and only green cells were observed, indicating the total recovery of the integrity of the membranes.

The first assay to verify the metabolic activity of nonculturable cells involved the desiccation of *P. putida* KT2440::*gfp*, a strain that constitutively expresses the green fluorescent protein (GFP) [39]. *P. putida* KT2440::*gfp* tolerated air desiccation at a level similar to that of wild-type and the presence of nonculturable cells were observed after 12 DABD. However, in all the experiments, fluorescent cells were observed without an apparent decrease in intensity at 15 DABD, with a slight decrease at 18 DABD. This result suggests the occurrence of active metabolic activity in rehydrated nonculturable cells. GFP studies have also been carried out with other models to evaluate the VBNC state of cells [46,50]. In our work, the fluorescence intensity and microscopic observation of green cells confirmed the viability and cellular activity of nonculturable rehydrated *P. putida* KT2440::*gfp* cells.

Molecular tools such as RT-PCR and RT-qPCR have been widely used to determine cellular viability because the average lifetime of mRNA is approximately 3 to 5 min. Thus, amplified RNA molecules arise from active and recent transcription and are an excellent indicator of metabolic activity in VBNC cells [51,52]. To increase our knowledge of the cellular activity of nonculturable rehydrated *P. putida* KT2440 cells, we monitored the expression of housekeeping genes (*RpoN* and 16S rRNA), genes encoding proteins from the mismatch repair complex (*mutL* and *mutS*), and a gene encoding an outer membrane protein (*oprH*) both before desiccation and at 18 DABD. All



explored genes in the present work were amplified from RNA samples after a short period of rehydration of nonculturable *P. putida* KT2440 cells, indicating active expression of the genes in that state and consequently active metabolic activity. 16S rRNA has been widely used to explore the VBNC state of bacteria [53,54], and in our work, it was the first gene selected to evaluate cell activity, as ribosomal genes were observed to be active after rehydration. The gene *rpoN* encodes the  $\sigma^{54}$  factor from RNA polymerase and regulates the expression of several genes [55–57]. This housekeeping gene (*rpoN*) was used as a reference gene for the RT-qPCR in this study. After amplification with RT-qPCR, it was observed that the *oprH*, *mutL* and *mutS* genes in nonculturable rehydrated *P. putida* KT2440 cells were expressed. The *oprH* gene encodes one of the most abundant membrane proteins of the genus *Pseudomonas*, which functions mainly as an aquaporin and a drug transporter efflux protein and is important for the maintenance and support of the membrane [58]. Expression of the *oprH* gene has been observed to be highly induced by high oxygen pressure conditions, likely as a consequence of plasmatic membrane destabilization caused by this type of stress [58]. In our work, the expression of the *oprH* gene highly increased at 6 DABD, suggesting that under desiccation conditions, the destabilization of cell membranes occurs, which is supported by the increase in red bacterial cells observed under fluorescence microscopy. Although *oprH* gene expression decreased at 12 and 18 DABD, this expression was higher than that observed for the *mutL* and *mutS* genes; therefore, we propose this gene as an indicator of viability in *P. putida* KT2440 under desiccation stress.

The *mutL* and *mutS* genes codify proteins from the mismatch repair complex, which acts in DNA replication and is also involved in the signaling process to prevent chemical damage that could occur under air desiccation, such as oxidation, Maillard reactions, and DNA damage [18,59]. Therefore, *mutL* and *mutS* could be fundamental genes involved in DNA reparation, and the study of the rehydration of desiccated *P. putida* KT2440 cells was carried out. Our results show a

decrease in the expression of the *mutL* gene in nonculturable cells after rehydration, but this gene was expressed over time. For the *mutS* gene, the expression was similar in culturable and nonculturable cells. Therefore, these genes could be involved in DNA reparation in cells damaged by desiccation. In our work, RT-PCR of the *gfp* gene from nonculturable cells was not performed, and it will be interesting to carry out such assays in the future.

## Conclusions

*Pseudomonas putida* KT2440 has very low tolerance to air desiccation in comparison to other bacteria; however, trehalose protects it from stress and could be used to design powder-stable inoculants with the capability to maintain the viability of the strain without the use of a vacuum, decreasing the cost of production. Furthermore, this bacterium enters the VBNC state during desiccation without protector addition, which could be a strategy to mitigate the stress. *P. putida* KT2440 cells in a desiccated state have a decreased cell size and retracted cytoplasm. Desiccation also causes damage to the membranes of *P. putida* KT2440, and these membranes can apparently be repaired after prolonged rehydration or rehydration in the presence of plant root exudates. After a short rehydration period, the bacterial cells are not capable of growth in culture media (VBNC state); however, the transcription of several genes remains active under these conditions in the wild-type strain, and GFP activity was also detected in cells targeted with the *gfp* gene, showing active metabolic activity after the rehydration of desiccated cells. Data from the present work support that during desiccation, this bacterial strain suffers damage to its membranes and enters the VBNC state, and the bacterial cells return to a culturable state after their interaction with plant roots or prolonged rehydration when the membranes are repaired. Therefore, this work will contribute to the development of bacterial inoculants containing live bacteria in a VBNC state that could

return to a culturable state after interaction with root plants when water conditions are completely favorable to germination, leading to successful colonization and the maintenance of their beneficial effects.

This work opens new avenues of research in the field of bacterial survival under desiccation stress and breaks the paradigm of the bacterial membrane integrity concept. Today, people think that if the membrane is affected, then the bacteria are dead, but we showed that even though the *P. putida* KT2440 membrane was affected, this bacterium was able to return to a culturable state if environmental conditions were favorable for its growth. The results of the present work could be taken into account to design bacterial inoculants for application in agriculture, by using live bacteria in a VBNC state that can return to a culturable state after the interacting with plant roots when the conditions are favorable for germination and colonization. The inoculant industry adheres to some norms regarding the number of bacteria in inoculant formulations that indicate that when the number decreases below a specified threshold, the inoculant should be discarded. However, whether the bacteria are truly dead or remain only nonculturable should be considered because the bacteria could return to a culturable state after their interaction with plants.

## Acknowledgments

We are grateful to CONACYT for the fellowship awarded to Laura Abisaí Pazos-Rojas, Ligia Catalina Muñoz-Arenas, Osvaldo Rodríguez-Andrade and Lester Emanuel López-Cruz.

## References

1. Espinosa-Urgel M, Kolter R, Ramos J-L. Root colonization by *Pseudomonas putida*: love at first sight. *Microbiology*. 2002;148: 341–344. doi:10.1099/00221287-148-2-341

2. Ramos-Gonzalez MI, Ramos-Diaz MA, Ramos JL. Chromosomal gene capture mediated by the *Pseudomonas putida* TOL catabolic plasmid. *J Bacteriol.* 1994;176: 4635–4641. doi:10.1128/jb.176.15.4635-4641.1994
3. Timmis KN. *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist *par excellence*. *Environ Microbiol.* 2002;4: 779–781. doi:10.1046/j.1462-2920.2002.00365.x
4. Matilla MA, Ramos JL, Bakker PAHM, Doornbos R, Badri D V., Vivanco JM, et al. *Pseudomonas putida* KT2440 causes induced systemic resistance and changes in *Arabidopsis* root exudation. *Environ Microbiol Rep.* 2009;2: 381–388. doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00091.x
5. Molina-Romero D, Morales-García YE, Hernández-Tenorio A-L, Castañeda-Lucio M, Netzahuatl-Muñoz AR, Muñoz-Rojas J. *Pseudomonas putida* estimula el crecimiento de maíz en función de la temperatura. *Rev Iberoam Ciencias.* 2017;4: 80–88.
6. Molina-Romero D, Baez A, Quintero-Hernández V, Castañeda-Lucio M, Fuentes-Ramírez LE, Bustillos-Cristales M del R, et al. Compatible bacterial mixture, tolerant to desiccation, improves maize plant growth. *PLoS One. Public Library of Science;* 2017;12: e0187913. Available: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187913>
7. Martins Dos Santos VAP, Heim S, Moore ERB, Strätz M, Timmis KN. Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol.* 2004;6: 1264–1286. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00734.x
8. Wackett LP. *Pseudomonas putida*—a versatile biocatalyst. *Nat Biotechnol. Nature Publishing Group;* 2003;21: 136–138. Available: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0203-136>
9. Pineda-Molina E, Reyes-Darias JA, Lacal J, Ramos JL, García-Ruiz JM, Gavira JA, et al. Evidence for chemoreceptors with bimodular ligand-binding regions harboring two signal-binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109: 18926–18931.

- doi:10.1073/pnas.1201400109
10. Krell T, Lacal J, Reyes-Darias JA, Jimenez-Sanchez C, Sungthong R, Ortega-Calvo JJ. Bioavailability of pollutants and chemotaxis. *Curr Opin Biotechnol.* 2013;24: 451–456. doi:10.1016/j.copbio.2012.08.011
  11. Wu X, Monchy S, Taghavi S, Zhu W, Ramos J, van der Lelie D. Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35: 299–323. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00249.x
  12. Muñoz-Rojas J, Bernal P, Duque E, Godoy P, Segura A, Ramos JL. Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72: 472–477.
  13. Manzanera M, Castro AG De, Tøndervik A, Strøm AR, Tunnacliffe A. Hydroxyectoine is superior to trehalose for anhydrobiotic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68: 4328–4333. doi:10.1128/AEM.68.9.4328
  14. Roszak DB, Colwell RR. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol Rev.* 1987;51: 365–379. doi:0146-0749/87/030365-15
  15. Chookietwattana K, Maneewan K. Selection of efficient salt-tolerant bacteria containing ACC deaminase for promotion of tomato growth under salinity stress. *Soil Environ.* Faisalabad: Soil Science Society of Pakistan; 2012;31: 30–36.
  16. He H, Chen Y, Li X, Cheng Y, Yang C, Zeng G. Influence of salinity on microorganisms in activated sludge processes: A review. *Int Biodeterior Biodegradation.* 2017;119: 520–527. doi:https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.10.007
  17. Vilchez S, Manzanera M. Biotechnological uses of desiccation-tolerant microorganisms for the rhizoremediation of soils subjected to seasonal drought. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;91: 1297. doi:10.1007/s00253-011-3461-6

18. Potts M. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1994;58: 755–805.
19. Potts M, Slaughter SM, Hunneke F-U, Garst JF, Helm RF. Desiccation tolerance of Prokaryotes: application of principles to human cells. *Integr Comp Biol.* 2005;45: 800–809.
20. Pazos-Rojas LA, Rodríguez-Andrade O, Muñoz-Arenas LC, Morales-García YE, Corral-Lugo A, Quintero-Hernández V, et al. Desiccation-tolerant rhizobacteria maintain their plant growth- promoting capability after experiencing extreme water stress. *SciFed J Appl Microbiol.* 2018;2: 1–13.
21. Streeter JG. Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. *J Appl Microbiol.* 2003;95: 484–491. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02017.x
22. Barnard RL, Osborne CA, Firestone MK. Responses of soil bacterial and fungal communities to extreme desiccation and rewetting. *ISME J. International Society for Microbial Ecology;* 2013;7: 2229–2241. Available: <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.104>
23. Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2010;34: 415–425. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x
24. Orruño M, Kaberdin VR, Arana I. Survival strategies of *Escherichia coli* and *Vibrio* spp.: contribution of the viable but nonculturable phenotype to their stress-resistance and persistence in adverse environments. *World J Microbiol Biotechnol.* Springer Netherlands; 2017;33: 45. doi:10.1007/s11274-017-2218-5
25. Stokell JR, Steck TR. Viable but nonculturable bacteria. *eLS.* 2012. pp. 1–8. doi:10.1002/9780470015902.a0000407.pub2
26. Vriezen JAC, de Bruijn FJ, Nüsslein KR. Desiccation induces viable but non-culturable cells in *Sinorhizobium meliloti* 1021. *AMB Express.* 2012;2: 1–9. doi:10.1186/2191-0855-

2-6

27. Oliver JD. The public health significance of viable but nonculturable bacteria. In: Colwell RR, Grimes DJ, editors. *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. Boston, MA: Springer US; 2000. pp. 277–300. doi:10.1007/978-1-4757-0271-2\_16
28. Dopp E, Richard J, Dwidjosiswojo Z, Simon A, Wingender J. Influence of the copper-induced viable but non-culturable state on the toxicity of *Pseudomonas aeruginosa* towards human bronchial epithelial cells in vitro. *Int J Hyg Environ Health*. Elsevier; 2017;220: 1363–1369. doi:10.1016/j.ijheh.2017.09.007
29. Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol*. Department of Biology, University of North Carolina at Charlotte, Charlotte, NC 28223-0001, USA. jdoliver@unc.edu; 2005;43: 93–100. Available: <http://europepmc.org/abstract/MED/15765062>
30. Trevors JT. Viable but non-culturable (VBNC) bacteria: Gene expression in planktonic and biofilm cells. *J Microbiol Methods*. Elsevier B.V.; 2011;86: 266–273. doi:10.1016/j.mimet.2011.04.018
31. Robben C, Fister S, Witte AK, Schoder D, Rossmanith P, Mester P. Induction of the viable but non-culturable state in bacterial pathogens by household cleaners and inorganic salts. *Sci Rep*. Springer US; 2018;8: 15132. doi:10.1038/s41598-018-33595-5
32. Zhao X, Zhong J, Wei C, Lin CW, Ding T. Current perspectives on viable but non-culturable state in foodborne pathogens. *Front Microbiol*. 2017;8: 1–16. doi:10.3389/fmicb.2017.00580
33. Molina-Romero D, Baez A, Quintero-Hernández V, Castañeda-Lucio M, Fuentes-Ramírez LE, Bustillos-Cristales M del R, et al. Selection assay to identify desiccation tolerant bacteria [Internet]. *Protocols.io PLOS one*. 2017. pp. 1–2.

doi:dx.doi.org/10.17504/protocols.io.j4icque

34. Corral-Lugo A, Morales-García YE, Pazos-Rojas LA, Ramírez-Valverde A, Martínez-Contreras RD, Muñoz-Rojas J. Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de “goteo en placa por sellado (o estampado) masivo.” *Rev Colomb Biotechnol.* 2012;14: 147–156.
35. Reyes-Darias JA, García V, Rico-Jiménez M, Corral-Lugo A, Lesouhaitier O, Juárez-Hernández D, et al. Specific gamma-aminobutyrate chemotaxis in pseudomonads with different lifestyle. *Mol Microbiol.* 2015;97: 488–501. doi:10.1111/mmi.13045
36. Rodríguez-Andrade O, Fuentes-Ramírez LE, Morales-García YE, Molina-Romero D, Bustillos-Cristales MR, Martínez-Contreras RD, et al. The decrease in the population of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane after nitrogen fertilization is related to plant physiology in split root experiments. *Rev Argentina Microbiol.* 2015;47: 335–43. doi:10.1016/j.ram.2015.09.004
37. Morales-García YE, Juárez-Hernández D, Aragón-Hernández C, Mascarua-Esparza MA, Bustillos-Cristales MR, Fuentes-Ramírez LE, et al. Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter* spp., as a model for alternative agriculture. *Rev Argent Microbiol.* 2011;43: 287–293. doi:10.1590/S0325-75412011000400009
38. Muñoz-Rojas J, Caballero-Mellado J. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. *Microb Ecol.* 2003;46: 454–464.
39. Yousef-Coronado F, Travieso ML, Espinosa-Urgel M. Different, overlapping mechanisms for colonization of abiotic and plant surfaces by *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol Lett.* 2008;288: 118–124. Available: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01339.x>
40. Baez A, Flores N, Bolívar F, Ramírez OT. Metabolic and transcriptional response of



- recombinant *Escherichia coli* to elevated dissolved carbon dioxide concentrations. *Biotechnol Bioeng.* 2009;104: 102–110. doi:10.1002/bit.22379
41. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods.* 2001;25: 402–408.  
doi:<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
42. Matilla MA, Krell T. Plant growth promotion and biocontrol mediated by plant-associated bacteria. In: Egamberdieva D, Ahmad P, editors. *Plant Microbiome: Stress Response.* Singapore: Springer Singapore; 2018. pp. 45–80. doi:10.1007/978-981-10-5514-0\_3
43. Mwita L, Chan WY, Pretorius T, Lyantagaye SL, Lapa S V., Avdeeva L V., et al. Gene expression regulation in the plant growth promoting *Bacillus atrophaeus* UCMB-5137 stimulated by maize root exudates. *Gene.* Elsevier B.V.; 2016;590: 18–28.  
doi:10.1016/j.gene.2016.05.045
44. da Silva Lima L, Olivares FL, Rodrigues de Oliveira R, Vega MRG, Aguiar NO, Canellas LP. Root exudate profiling of maize seedlings inoculated with *Herbaspirillum seropedicae* and humic acids. *Chem Biol Technol Agric.* 2014;1: 1–18. doi:10.1186/s40538-014-0023-z
45. Walker TS, Bais HP, Grotewold E, Vivanco JM. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.* 2003;132: 44–51. Available:  
<http://www.plantphysiol.org/content/132/1/44.abstract>
46. Lowder M, Unge A, Maraha N, Jansson JK, Swiggett J, Oliver JD. Effect of starvation and the viable-but-nonculturable state on green fluorescent protein (GFP) fluorescence in GFP-tagged *Pseudomonas fluorescens* A506. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66: 3160–3165.  
doi:10.1128/AEM.66.8.3160-3165.2000.Updated
47. Liu Y, Wang C, Fung C, Li XF. Quantification of viable but nonculturable *Escherichia*

- coli* O157:H7 by targeting the *rpoS* mRNA. *Anal Chem.* 2010;82: 2612–2615.  
doi:10.1021/ac1003272
48. Scherber CM, Schottel JL, Aksan A. Membrane phase behavior of *Escherichia coli* during desiccation, rehydration, and growth recovery. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2009;1788: 2427–2435. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.08.011
49. Vriezen JAC, de Bruijn FJ. Appearance of membrane compromised, viable but not culturable and culturable rhizobial cells as a consequence of desiccation. *Biological Nitrogen Fixation.* 2015. pp. 977–989. doi:doi:10.1002/9781119053095.ch96
50. Tombolini R, Unge A, Davey ME, de Bruijn FJ, Jansson JK. Flow cytometric and microscopic analysis of GFP-tagged *Pseudomonas fluorescens* bacteria. *FEMS Microbiol Ecol.* 1997;22: 17–28. Available: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.1997.tb00352.x>
51. Buck A, Oliver JD. Survival of spinach-associated *Helicobacter pylori* in the viable but nonculturable state. *Food Control.* Elsevier Ltd; 2010;21: 1150–1154.  
doi:10.1016/j.foodcont.2010.01.010
52. Conway T, Schoolnik GK. Microarray expression profiling: Capturing a genome-wide portrait of the transcriptome. *Mol Microbiol.* 2003;47: 879–889. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03338.x
53. Yaron S, Matthews KR. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* O157:H7: Investigation of specific target genes. *J Appl Microbiol.* 2002;92: 633–640. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01563.x
54. Lahtinen SJ, Ahokoski H, Reinikainen JP, Gueimonde M, Nurmi J, Ouwehand AC, et al. Degradation of 16S rRNA and attributes of viability of viable but nonculturable probiotic bacteria. *Lett Appl Microbiol.* 2008;46: 693–698. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02374.x
55. Hirschman J, Keener J, Kustu S. products of nitrogen regulatory genes *ntrA* and *ntrC* of

- enteric bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82: 7525–7529.
56. Dixon R. The xylABC promoter from the *Pseudomonas putida* TOL plamid is activated by nitrogen regulatory genes in *Escherichia coli*. *MGG Mol Gen Genet*. 1986;203: 129–136. doi:10.1007/BF00330393
57. Ramos JL, Mermoud N, Timmis KN. Regulatory circuits controlling transcription of TOL plasmid operon encoding meta-cleavage pathway for degradation of alkylbenzoates by *Pseudomonas*. *Mol Microbiol*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111); 1987;1: 293–300. doi:10.1111/j.1365-2958.1987.tb01935.x
58. Follonier S, Escapa IF, Fonseca PM, Henes B, Panke S, Zinn M, et al. New insights on the reorganization of gene transcription in *Pseudomonas putida* KT2440 at elevated pressure. *Microb Cell Fact*. 2013;12: 1–18. doi:10.1186/1475-2859-12-30
59. Brierley DJ, Martin SA. Oxidative stress and the DNA mismatch repair pathway. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18: 2420–2428. doi:10.1089/ars.2012.4994