



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

“Aislamiento de nuevas cepas tolerantes a desecación y sus aplicaciones biotecnológicas”

Memoria que presenta **Juan Jesús Narváez Reinaldo** para optar al grado de Doctor Europeo, por el programa de Biología Fundamental y de Sistemas de la Universidad de Granada, 2012.

LOS DIRECTORES DEL TRABAJO:

Dr. Maximino Manzanera Ruiz
Profesor Titular del Dpto. de Microbiología
Universidad de Granada

Dr. Jesús González López
Catedrático del Dpto. de Microbiología
Universidad de Granada

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Juan Jesús Narváez Reinaldo
D.L.: GR 343-2013
ISBN: 978-84-9028-350-9

Producción científica

Los resultados expuestos en la presente tesis ha dado lugar a la siguiente producción científica:

1. *Publicaciones en Revistas*

1. **Título:** RAPID METHOD FOR ISOLATION OF DESICCATION-TOLERANT STRAINS AND XEROPROTECTANS

Revista: Applied and Environmental Microbiology

Año: 2010

Volumen: 76

Número: 15

Página inicial: 5254

Página final: 5262

Autores: Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Barba-,Ignasi; González-López, Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino

Índice de impacto (ISI): 3.778

2. *Capítulos de Libros*

2. **Título del capítulo:** CONTRIBUCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN EL MANTENIMIENTO DE LA BIODIVERSIDAD EN SUELOS ÁRIDOS Y SEMIÁRIDOS

Autores del capítulo: Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Manzanera-Ruiz, Maximino; Santa Cruz-Calvo, Lucía; González-López, Jesús; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Picazo-Espinosa, Rafael

Título del libro: III CONGRESO NACIONAL DE BIODIVERSIDAD

Autores del libro:

Lugar: GRANADA, ESPAÑA

Editorial: CSIC, UGR

Año: 2011

3. **Título del capítulo:** NEW ISOLATION METHOD OF DESICCATION-TOLERANT MICROORGANISMS FOR THE BIOREMEDIATION OF ARID AND SEMIARID SOILS

Autores del capítulo: Manzanera-Ruiz, Maximino; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Santa Cruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; González-López, Jesús; Calvo-Sainz, Concepción

Título del libro: ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY III

Autores del libro:

Lugar: SOUTHAMPTON, REINO UNIDO

Editorial: WITPRESS

ISBN: 978-1-84564-438-3

Año: 2010

4. **Título del capítulo:** PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA FOR PROTECTION AGAINST DROUGHT

Autores del capítulo: Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Santa Cruz-Calvo, Lucía; Picazo-Espinosa, Rafael; González-López, Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino

Título del libro: BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION AND PLANT-ASSOCIATED MICROORGANISMS

Autores del libro:

Lugar: ZARAGOZA

Editorial: GRÁFICAS ALÓS, S.A.

Año: 2010

3. *Aportaciones a Congresos, etc.*

5. **Título de la aportación:** Improvement in the rhizoremediation efficiency by the use of xeroprotective microorganisms.

Nombre del congreso: 5º International Symposium on Biosorption and Bioremediation

Tipo de evento: Comunicación en congreso

Ámbito: Internacional

Año: 2010

Lugar: Praga (Rep. Checa)

Autores: Manzanera M.; Vilchez J.I.; Narváez-Reinaldo J.J., Santacruz-Calvo L., Picazo-Espinosa R., González-López J.

6. **Título de la aportación:** New method for the isolation of Drought Plant Protecting Rhizobacteria

Nombre del congreso: Biotecnología Habana 2011

Tipo de evento: Poster en Exposición

Ámbito: Internacional

Año: 2011

Lugar: Cuba

Autores: Manzanera-Ruiz, Maximino; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Santa Cruz-Calvo, Lucía; Picazo-Espinosa, Rafael; Julca-Chavez, Irene Consuelo; Calvo-Sainz, Concepción; González-López, Jesús

7. **Título de la aportación:** UTILIZACIÓN DE GRASAS DE AGUAS RESIDUALES PARA LA PRODUCCIÓN DE MICRO-COMBUSTIBLES

Nombre del congreso: XXIII Congreso Nacional de Microbiología

Tipo de evento: Poster en Congreso

Ámbito: Nacional

Año: 2011

Lugar: Salamanca (España)

Autores: Picazo-Espinosa, Rafael; Santa Cruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; González-López, Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino

Producción científica

8. **Título de la aportación:** UTILIZACIÓN DE LA APLICACIÓN MULTIPLATAFORMA I-TUNES COMO HERRAMIENTA DE APOYO PARA LA DOCENCIA UNIVERSITARIA (I-LABBOOK)

Nombre del congreso: XXIII Congreso Nacional de Microbiología

Tipo de evento: Poster en Congreso

Ámbito: Nacional

Año: 2011

Lugar: Salamanca (España)

Autores: Picazo-Espinosa, Rafael; Santa Cruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino; Vilchez-Tornero, Susana

9. **Título de la aportación:** RIZORREMEDIACIÓN DE SUELOS SOMETIDOS A SEQUÍA CON ESPECIESTOLERANTES A LA FALTA DE AGUA

Nombre del congreso: XXIII Congreso Nacional de Microbiología

Tipo de evento: Poster en Congreso

Ámbito: Nacional

Año: 2011

Lugar: Salamanca (España)

Autores: Picazo-Espinosa, Rafael; Santa Cruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Calvo-Sainz, Concepción; González-López, Jesús

10. **Título de la aportación:** CONTRIBUCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN EL MANTENIMIENTO DE LA BIODIVERSIDAD EN SUELOS ÁRIDOS Y SEMIÁRIDOS

Nombre del congreso: III Congreso Nacional de Biodiversidad (Granada, 2011)

Tipo de evento: Conferencia Congreso no publicada

Ámbito: Nacional

Año: 2011

Lugar: Granada (España)

Autores: Manzanera-Ruiz, Maximino; Santa Cruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Oliver-Jacobo, Amparo; Picazo-Espinosa, Rafael; González-López, Jesús

11. **Título de la aportación:** Isolation of desiccation tolerant micro-organisms for the rhizoremediation of soils subjected to seasonal drought

Nombre del congreso: Environmental Toxicology 2010

Tipo de evento: Comunicación en congreso

Ámbito: Internacional

Año: 2010

Lugar: Chipre

Autores: Santa Cruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Picazo-Espinosa, Rafael; González-López, Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino

12. Título de la aportación: PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA FOR PROTECTION AGAINST DROUGHT

Nombre del congreso: National meeting of the Spanish society of nitrogen fixation (SEFIN) (13th Zaragoza, 2010) Portuguese-Spanish congress on nitrogen fixation (2nd Zaragoza, 2010) España

Tipo de evento: Comunicación en congreso

Ámbito: Internacional

Año: 2010

Lugar: Zaragoza (España)

Autores: Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Santa Cruz-Calvo, Lucía; Picazo-Espinosa, Rafael; González-López, Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino

13. Título de la aportación: USE OF DESICCATION TOLERANT ACTINOBACTERIA ISOLATES FOR STABILIZATION OF BIOLOGICAL MATERIAL OF BIOTECHNOLOGICAL INTEREST

Nombre del congreso: 14th International Byotechnology Symposium and Exhibition (2010, Rimini (Italia))

Tipo de evento: Poster en Congreso

Ámbito: Internacional

Año: 2010

Lugar: Rimini (Italia)

Autores: Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Santa Cruz-Calvo, Lucía; Picazo-Espinosa, Rafael; González-López, Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino

14. Título de la aportación: BIOTECHNOLOGICAL USES OF DESICCATION TOLERANT MICROORGANISMS FOR THE RHYZOREMEDIATION OF SOILS SUBJECTED TO SEASONAL DROUGHT

Nombre del congreso: 14th International Byotechnology Symposium and Exhibition (2010, Rimini (Italia))

Tipo de evento: Poster en Congreso

Ámbito: Internacional

Año: 2010

Lugar: RIMINI (ITALIA)

Autores: Santa Cruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Picazo-Espinosa, Rafael; González-López, Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino

4. Propiedad Industrial e Intelectual

15. **Nombre:** CEPA BACTERIANA CECT7624, USO DE DICHA CEPA PARA AUMENTAR LA TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO DE UNA PLANTA Y COMPUESTO XEROPROTECTOR PRODUCIDO POR LA MISMA.

Número de patente: P200931119

Fecha de concesión: 04/12/09

Institución: UGR

Tipo de protección: Nacional

Autores: González-López, Jesús; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Manzanera-Ruiz, Maximino; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús

16. **Nombre:** CEPA BACTERIANA CECT7623, USOS Y PRODUCTO XEROPROTECTOR PRODUCIDO POR LA MISMA.

Número de patente: P200931116

Fecha de concesión: 04/12/09

Institución: UGR

Tipo de protección: Nacional

Autores: González-López, Jesús; Santa Cruz-Calvo, Lucía; Manzanera-Ruiz, Maximino; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús

17. **Nombre:** CEPA BACTERIANA CECT7626, USO DE DICHA CEPA PARA AUMENTAR LA TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO DE UNA PLANTA Y COMPUESTO XEROPROTECTOR PRODUCIDO POR LA MISMA.

Número de patente: P200931118

Fecha de concesión: 04/12/09

Institución: UGR

Tipo de protección: Nacional

Autores: González-López, Jesús; Santa Cruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Manzanera-Ruiz, Maximino; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús

18. **Nombre:** CEPA BACTERIANA CECT7625, USOS Y PRODUCTO XEROPROTECTOR PRODUCIDO POR LA MISMA.

Número de patente: P200931117

Fecha de concesión: 04/12/09

Institución: UGR

Tipo de protección: Nacional

Autores: González-López, Jesús; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino

Producción científica

19. **Nombre:** CEPA BACTERIANA CECT7625, USOS Y PRODUCTO XEROPROTECTOR PRODUCIDO POR LA MISMA.

Número de patente: P201100029

Fecha de concesión: 03/12/09

Institución: UGR

Tipo de protección: Nacional

Autores: González-López, Jesús; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino

20. **Nombre:** CEPA BACTERIANA CECT7623, USOS Y PRODUCTO XEROPROTECTOR PRODUCIDO POR LA MISMA.

Número de patente: P201100031

Fecha de concesión: 03/12/09

Institución: UGR

Tipo de protección: Nacional

Autores: González-López, Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Santa Cruz-Calvo, Lucía

21. **Nombre:** CEPA BACTERIANA CECT7624, USO DE DICHA CEPA PARA AUMENTAR LA TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO DE UNA PLANTA Y COMPUESTO XEROPROTECTOR PRODUCIDO POR LA MISMA.

Número de patente: P201100032

Fecha de concesión: 03/12/09

Institución: UGR

Tipo de protección: Nacional

Autores: González-López, Jesús; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús; Santa Cruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Manzanera-Ruiz, Maximino

22. **Nombre:** CEPA BACTERIANA CECT7624, USO DE DICHA CEPA PARA AUMENTAR LA TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO DE UNA PLANTA Y COMPUESTO XEROPROTECTOR PRODUCIDO POR LA MISMA.

Número de patente: P201100033

Fecha de concesión: 03/12/09

Institución: UGR

Tipo de protección: Nacional

Autores: González-López, Jesús; Manzanera-Ruiz, Maximino; Santa Cruz-Calvo, Lucía; Vilchez-Morillas, Juan Ignacio; Narváez-Reinaldo, Juan Jesús

23. **Nombre:** CEPA BACTERIANA CECT7626, USO DE DICHA CEPA PARA AUMENTAR LA TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO DE UNA PLANTA Y COMPUESTO XEROPROTECTOR PRODUCIDO POR LA MISMA

Número de patente: P201100030

Agradecimientos

Al Dr. Maximino Manzanera por tutorizar este trabajo, por tus consejos, por tu paciencia, por intentar sacar siempre el máximo rendimiento de las cosas, por tu profesionalidad, por instruirme como investigador.

Al Dr. Jesús González López por permitirme formar parte de tu grupo de investigación, por tus consejos, por estar siempre disponible para calmar mis inquietudes, por apostar por mí.

A la Dr. María Victoria Martínez Toledo por formarme como ambientólogo, por proponerme para este proyecto, por permitirme cumplir la ilusión de impartir docencia en ciencias ambientales, por tu amabilidad conmigo.

Al Dr. Alan Tunnacliffe y su equipo del Instituto de Biotecnología de la Universidad de Cambridge, por acogerme como uno más durante mi estancia. A mis “primas” de Cambridge, Ana y Claudia, por los buenos momentos vividos.

Al Departamento de Microbiología y al Instituto del Agua de la Universidad de Granada por facilitarme el trabajo. Al Ministerio de Educación y Ciencia, así como a la Consejería de Innovación por financiar el presente trabajo.

A mi familia por apoyarme incondicionalmente, por la educación que me habéis dado, por regalarme la vida, por luchar por mí felicidad, por inculcarme los valores que me convierten en la persona que soy.

A mis amigos, por crear los momentos más divertidos de mi vida en estos años de Universidad. A Juanjo, José, Jesús, Juanri, Juanlu, Manu, Pepe y Avelino, jamás podremos olvidar nuestro Mundial, nuestra Eurocopa y nuestros sábados de fiesta. A la gente de la residencia, porque todavía tengo agujetas en la cara de las carcajadas que hemos compartido. A mis amigos de Ciencias Ambientales, porqué forjamos lazos de amistad que perduran en el tiempo. A mis antiguos compañeros de piso, por arrancarme sonrisas cuando más lo necesitaba.

A la gente que en estos 4 años han pasado en algún momento por el laboratorio y especialmente a Sergio, por compartir novatadas; a Rafa, por estar siempre dispuesto a

Agradecimientos

ayudar; a Belén, por desprender vitalidad; a Carmen, por tú alegría; a Luis, por ver siempre el lado optimista de las cosas; a Nacho, por compartir los momentos más duros del laboratorio y también los más divertidos; a Rebeka, por tu irradiente alegría y ayuda con los cultivos vegetales; a “los Manolos”, por vuestra inestimable ayuda en las experiencias de campo; a Juan Carlos, por las tertulias en comedores. A mis ambientólogas: Cristina, María, Patri y Paula; por vuestro sincero y desinteresado sentido del compañerismo. A Ginés por tu afán de colaborar, incluso fuera de tu jornada de trabajo, por tu simpatía, tu alegría y sobre todo.... ¡¡¡Por todas las tapas “Vips” que nos has conseguido en el Mauri!!!. Al resto de la gente del laboratorio con las que he compartido algún buen momento o en algún momento me han ayudado de alguna manera.

A Tíscar porque sin ti estos últimos meses de escritura habrían sido insoportables, por tu capacidad de convertir los días más negros en los mejores, por hacerme feliz. Tú eres sin duda el descubrimiento más importante en esta etapa de mi vida. TQM!!!

“Lo que embellece al desierto es que en alguna parte esconde un pozo de agua”

Saint-Exupery

**“La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de vida de todo
progreso”**

Louis Pasteur

Compromiso de respeto de derechos de autor

El doctorando Juan Jesús Narvárez Reinaldo y los directores de la tesis los Drs Maximino Manzanera y Jesús González López garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada a 12 de Julio de 2012.

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.: Dr. Maximino Manzanera Ruiz
Dr. Jesús González López

Fdo.: Juan Jesús Narvárez Reinaldo

Índice

INTRODUCCIÓN	1
1 – Water in life	1
2 – Anhydrobiosis	1
3 – Tolerance mechanisms of anhydrobionts	4
3.1 – Synthesis of compatibles solutes	5
3.2 – Scialized proteins	7
3.3 – Modification of the membrane	9
3.4 – Production of exopolysaccharide (EPS) and extracellular DNA	9
3.5 – Other physiological mechanism	12
4 – Protection hypothesis of compatible solutes	13
4.1 – Water replacement hypothesis	13
4.2 – Glass formation hypothesis	14
4.2.1 – Maillard reactions	15
4.3 – Water entrapment hypothesis	17
5 – Biotechnological applications in preserving biomaterials	19
5.1 – Preservation of biomolecules	19
5.1.1 – Addition of stabilizing agents	20
5.1.2 – Storage at low temperature	20
5.1.3 – Lyophilization	21
5.1.4 – Air Drying	23
5.2- Preservation of cells	23
5.2.1 – Prokaryotic cells	23
5.2.1.1 – Cryopreservation	24
5.2.1.2 - Freeze-drying	24
5.2.1.3 – Vacuum drying	25
5.2.2 – Eukaryotic cells	26
5.2.2.1 – Cryopreservation	26
5.2.2.2 – Xeropreservation	26
5.3 – Preservation of tissues and organs	28
6 – Xeroprotection of crops by bacteria	29
6.1 – Plant Growth Promoting Rhizobacteria	29
6.2 – Crops protection to water stress by PGPR's	32
OBJETIVOS	36
MATERIALES Y MÉTODOS	38

Índice

1 – Cepas bacterianas	38
2- Medios de cultivos	38
2.1 – Medios enriquecidos	38
2.2 – Medios mínimos	38
2.2.1 – Medio mínimo M9	39
2.3 – Condiciones de cultivo	39
3 – Conservación de cepas	40
4 – Manipulación de ADN	40
4.1 – Minipreparación de ADN total	40
4.2 – Aislamiento de ADN total a gran escala	41
4.3 – Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasas termorresistente (PCR)	41
4.4 – Electroforesis de ADN en geles de agarosa	42
4.5 – Limpieza de las muestras de PCR	41
4.6 – Secuenciación de ADN	43
4.7 – Cuantificación de ADN en las muestras estudiadas	43
4.8 – Tratamiento con ADNasas y ARNasas	44
5 - Ensayo rápido de esporulación	45
6 – Ensayo de xeroprotección de enzimas	44
7 – Ensayo de xeroprotección sobre células procariotas	45
8 – Espectroscopía por RMN (Kucey RMN)	45
9 – Modulación de reacciones de Maillard	46
10 - Experimentación con vegetales	46
10.1 – Especímenes vegetales	46
10.2 – Recubrimiento de semillas con las cepas bacterianas	46
10.3 – Cultivo y cuidado de plantas	47
10.4 – Toma de muestras de las plantas	47
10.5 – Cultivos de rábanos en huerto	48
11 – Programas informáticos utilizados	48
12 – Tratamiento estadístico de los resultados	48
RESULTADOS – CAPÍTULO 1º	52
1 – Aislamiento de cepas resistentes a desecación	52
1.1 – Tratamiento con cloroformo	52
1.2 – Ensayo de esporulación	53

Índice

1.3 – Ensayo de secado al aire_____	54
2 – Identificación taxonómica de las cepas resistentes a la desecación_____	57
3 – Validación de la metodología de aislamiento de bacterias hipertolerantes a sequía_____	59
RESULTADOS – CAPÍTULO 2°_____	63
1 – Caracterización de moléculas con propiedades xeroprotectores_____	63
1.1 – Ensayo de halotolerancia_____	65
1.2 – Ordeñado bacteriano_____	65
1.2.1 – Productos obtenidos mediante estrés osmótico_____	65
1.2.2 – Productos obtenidos mediante estrés por desecación_____	66
1.3 – Ensayo de xeroprotección_____	67
1.3.1 – Estabilización de enzimas con xeroprotectores por secado_____	67
1.3.2 – Estabilización de células procariotas con xeroprotectores_____	69
1.4 – Caracterización química de POBs y POBSIAs_____	71
1.5 – Ensayo de xeroprotección con reproducciones sintéticas_____	73
1.5.1 – Estabilización de enzimas con xeroprotectores sintéticos por secado_____	73
1.5.2 – Estabilización de células procariotas con xeroprotectores sintéticos_____	73
1.6 – Comparación del efecto xeroprotector de naturales y sintéticos_____	76
1.7 – Caracterización de otras moléculas en xeroprotectores naturales_____	77
1.7.1 – Estabilización de proteínas con POBs naturales en ausencia de ADN_____	80
1.7.2 – ADN como xeroprotectores_____	82
1.7.3 – Origen del ADN presente en POBs_____	83
1.7.4 – Modulación de reacciones de Maillard por ADN_____	85
1.8 – Mejora del POB S4J2A2-D_____	87
RESULTADOS – CAPÍTULO 3°_____	91
1 – Estudio de la colonización en rábanos por bacteria PGPR pegado a sus semillas por xeroprotectores_____	91
2 – Protección contra estrés hídrico por PGPR en rábanos_____	93
3 – Promoción del crecimiento de rábanos por los aislados xeroprotectores en condiciones de riego_____	94

Índice

4 – Protección de cultivos de rábanos frente al estrés hídrico por bacteria PGPR pegada a sus semillas	110
DISCUSIÓN	116
CONCLUSIONS	140
BIBLIOGRAFÍA	142

Resumen

El agua es la molécula más abundante en la materia viva. La cantidad de agua en los seres vivos oscila entre el 20% en tejidos óseos hasta el 85% en determinadas células cerebrales. Aunque en general, el contenido de agua va disminuyendo a medida que se produce el envejecimiento celular.

Los organismos pueden obtener el agua directamente del medio ambiente (agua exógena) o generarla a partir de otras moléculas orgánicas mediante diferentes reacciones bioquímicas (agua endógena o metabólica) (Potts, 1994).

El agua se considera como el disolvente universal y existe la asunción generalizada de que sin agua no puede existir la vida. Sin embargo, en el año 1894, Giard introdujo el término anhidrobiosis (del griego vida sin agua) como el proceso por el cual ciertos organismos son capaces de entrar en un estado de latencia ante la falta de agua.

La capacidad de sobrevivir a la falta de agua es uno de los fenómenos más interesantes y aún está muy lejos de comprenderse en su totalidad. Por lo tanto es importante partir de un mayor entendimiento de donde se localiza el agua en las células, los daños ocasionados ante la escasez de agua, de las respuestas de las células (tanto sensibles como tolerantes) ante la desecación, para así obtener el máximo rendimiento de las aplicaciones biotecnológicas que podemos conseguir de organismos tolerantes a la desecación. En base a ello, aislamos una colección de bacterias hipertolerantes a sequía y desarrollamos aplicaciones que van desde la estabilización de material biológico a partir sus xeroprotectores (o solutos compatibles) o por su inoculación en cultivos vegetales para protegerlos ante estrés hídrico.

INTRODUCTION

Introduction

1 - Water in life.

Water seems to be a very simple molecule, composed of two hydrogen atoms bound to an oxygen atom. However, it has many complex properties, making it essential to many life forms, including humans (Chaplin, 2001).

Prokaryotic organisms contain among 70 to 90% of water while eukaryotic cells, generally, contain between 75 to 80% of water, which is necessary to create the intracellular aqueous environment where all biological processes occur (Billi and Potts, 2002). In addition, water interacts with biomolecules and membranes, determines the structure, stability, activity, folding and assembly of proteins, regulates the structure of DNA and preserves the structure and function of membranes (Chaplin, 2001; Raschke, 2006).

For this reason, many researchers claim that Life as we know it, could not exist without water (Chaplin, 2001; Raschke, 2006), since its properties seem to fit perfectly into the requirements for carbon-based life (Chaplin, 2001) and it is considered the environment in which life occurs (Sun and Leopold, 1997). However, in nature, some organisms can survive in a dry state of suspended animation for extended periods of time, with loss of water of more than 99%, resulting in a dry state, where viable tissues contains less than 0.1 g of free water per gram of dry cell weight; this is a phenomenon known as anhydrobiosis (Alpert, 2005; Crowe, 1992a; Potts, 1994a).

2 – Anhydrobiosis.

Antony van Leeuwenhoek first described the phenomenon of the recovery of dried organisms upon the addition of water in 1702. This process was originally called "anabiosis" (back to life), because it was considered that these organisms were dead and came back to life after rehydration (Crowe, 1992a; Crowe, 2002). Years later, David Keilin published the term "anhydrobiosis" referring to "life without water" to define the state in which an organism does not show signs of life and in which it is difficult to measure metabolic activity, due to the loss of water from its cells (Clegg, 2001; Keilin, 1959; Potts, 2001; Rebecchi et al., 2007) that is to say, anhydrobiosis is the ability of cells to undergo almost complete dehydration (extreme), without lethal damage (Crowe,

Introduction

1992a). It has been suggested that this is the most severe stress due to water deficit, since the removal of bound water to the cell is imposed as a structural, physiological and biochemical stress, where cells must adapt or die (Billi and Potts, 2001). Also, it has been reported that with the resistance to the adverse effects of drying, these organisms are also capable of withstanding the effects of very low temperatures (freezing), high temperatures, organic solvents and the effects of ionising radiation (Crowe, 1992a; Rebecchi et al., 2007; Vilchez et al., 2008).

Anhydrobiosis occurs in many organisms, including bacteria, yeast cells, rotifers, tardigrades, eggs of some crustaceans (*Artemia salina*), nematodes, fungal spores, lichens, and in some higher and lower plants. These organisms, called anhydrobionts, can remain in the dry state as the only way of life in metabolic lethargy for decades or centuries and, when water becomes available, they rapidly rehydrate and resume an active life (Billi and Potts, 2001; Crowe, 1992b; Crowe, 2002; Potts, 1994b).

At bacterial level different microorganisms tolerate desiccation to different levels depending on their physiological state, environment or taxonomic group among other factors. Gram positive prokaryotes are the most tolerant microorganisms to desiccation (Daly et al., 2004). Table number 1 shows some examples of levels with different tolerance to desiccation.

Table 1. Desiccation tolerant species are shown (Abyzoz, 1993; Gilichinsky, 1992; Jhonston, 1991; Potts, 1994a; Potts, Unpublished data; Sakane, 1993; Sneath, 1962). Survival times for some strains are shown

Surface where treatment is performed	Species	Survival time
Glass under sun Light	<i>Vibrio cholerae</i>	30 s – 6 min
Petri plate	<i>Salmonella typhi</i>	6 – 60 min
Glass, blood in glass	<i>Treponema pallidum</i> <i>Leptospira interrogans serovar icterohaemorrhagiae</i>	6 – 60 min
Glass	<i>Klebsiella penumoniae</i> <i>Neisseria meningitidis</i>	6 – 60 min
Glass, dried blood	<i>Streptococcus salivarius</i> <i>Cowdria rumnatum</i> <i>Pasteurella multocida</i> <i>Escherichia coli</i>	6 – 60 min
Salt over glass, glass, milk in glass, blood in glass	<i>Serratia narcescens</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4 – 40 d

Introduction

Surface where treatment is performed	Species	Survival time
Sylk, dried urine, glass, dried blood, paper, line yarn	<i>Campylobacter fetus subs. jejuni</i> <i>Pasteurella multocida</i> <i>Proteus morgani</i>	4 – 40 d
Sylk, dried urine, glass, dried blood, paper, line yarn	<i>Mycobacterium avium</i> <i>Coxiella burnetii</i>	40 – 400 d
Skin cells, glass (over CaCl ₂), glass(in darkness)	<i>Micoplasma ycoides dubsp.</i> <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	40 – 400 d
Dried browth, straw, glass	<i>Nocardia asteroides</i>	40 – 400 d
Vacuum dried at 5°C in liquid form	<i>Haloarcula</i> spp. <i>Halobacteria</i> spp <i>Halococcus</i> spp	1 – 10 years
Straw y dried cereals	<i>Listeria monocytoenes</i>	1 – 10 years
Vacuum dried at 5°C	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	10 – 100 years
Spores over line in darkness, over slowly desiccation	<i>Bacillus anthracis</i>	10 – 100 years
Dried arables specimens	<i>Nostoc commune</i>	100 – 1.000 years
Herbal floors	<i>Bacillus</i> spp <i>Clostridium</i> spp.	100 – 1.000 years
Interspersed between the rock mineral Antarctic crystals	<i>Gloeocapsa</i> , <i>Hormathonema</i> - <i>Gloeocapsa</i> , <i>Chroococciopsis</i>	1.000 – 10.000 years
Permafrost (10m of depth)	<i>Coccus</i> Spore forming bacteria <i>Actinomycetes</i> Gram-negative bacillus	10.000 – 100.000 years
Permafrost (30m of depth)	<i>Coccus</i> <i>Actinomycetes</i>	10.000 – 100.000 years
Sands of permafrost of Pliocene (90m of depth)	<i>Coryneformes</i>	100.000 – 1.000.000 years

As it is shown in table 1, the most sensible strains to desiccation with survival time lower than 40 days, belong to *Enterobacteriaceae* group. Strains of this taxon usually are isolated from wet environment as human and animal intestines, oral cavity among other clinical specimens but also in lakes or rives. So they have well adapted to live in environments without water deficit. Sporulating bacteria taxonomical groups show high survival rate to desiccation (over 10 years), such as the gena *Bacillus* or *Clostridium*. Spores are single-celled reproductive body that is highly resistant to desiccation and heat and is capable of growing into a new organism, produced especially by certain bacteria. Apart from sporulating bacteria, the actinobacteria present the highest desiccation tolerance, as for example *Actinomycetes* and *Coryneformes*. Actinobacteria usually live in soils and have even found in very dry soils such as the Atacama desert, Taklamakan desert among others, or permafrost where water if present not in available

Introduction

forms. Therefore, actinobacteria is a taxon rich in bacterial strains adapted to live under intensive periods without water (Abyzoz, 1993; Gilichinsky, 1992; Jhonston, 1991; Potts, 1994a; Potts, Unpublished data; Sakane, 1993; Sneath, 1962).

3 - Tolerance mechanisms of anhydrobionts

There is a complex series of physiological and biochemical internal changes and adaptations that allow them to survive in dry environments (Potts, 1994). As a general rule, it is believed that at the cellular and molecular level of organisation, the principles that enable the stability of these organisms in the dry state are very similar due to the uniformity of cell structure and function (Crowe and Crowe, 1992). Thus, the synthesis of large amounts of sugars, in particular non-reducing disaccharides (such as trehalose and sucrose), is associated with the ability of these organisms to survive in the dry state (Billi et al., 2000; Crowe et al., 1987; de Castro et al., 2000). However, studies in some anhydrobiotic organisms have indicated that the mechanism of desiccation tolerance involves not only sugars, but also several osmolytes, non-enzymatic antioxidants and even proteins (antioxidant proteins and other types of specialised proteins) (Crowe et al., 2005; Illing et al., 2005). In the case of microorganisms it is also well known the DNA repair system as a strategy for desiccation tolerance in special for *Deinococcus radiodurans*. The robustness of this bacterium is due to strong oxidative stress resistance mechanisms that protect proteins from oxidative damage (Daly et al., 2007) and a DNA repair process that accomplishes an efficient and precise reassembly of DNA fragments (Slade et al., 2009; Zahradka et al., 2006). The antioxidation protection of DNA repair and other proteins as well as the multiples copies of the bacterium genome enables them to retain their catalytic activity and to provide a swift response under conditions of oxidative stress such as desiccation or radiation (Slade and Radman, 2011).

Among the different strategies developed by these organisms the synthesis of compatible solutes and specialized proteins is one of the most important ones. In addition we describe other physiological mechanism too:

Introduction

3.1 - Synthesis of compatible solutes

The accumulation of compatible solutes or osmolytes is a mechanism described in several species of different taxonomic groups, such as prokaryotes to counteract the effects of changes in extracellular osmolarity caused by desiccation and/or salinity, (Klähn and Hagemann, 2011), fungi (Magan, 2008), plants (Hoekstra et al., 2001) and animals including human cells (Garcia-Perez and Burg, 1991; Sizeland et al., 1993).

Compatible solutes are highly soluble organic compounds of low molecular weight that maintain osmotic balance thanks to processes such as osmoregulation without interfering with cell metabolism. They also have the function of stabilising proteins and cellular components (Hoekstra et al., 2001; Kempf and Bremer, 1998; Klähn and Hagemann, 2011; Yancey, 2005). Compatible solutes that protect anhydrobiotic organisms are called "xeroprotectants" (Vilchez S, 2008). Some of these solutes present protective metabolic roles and can act as antioxidants like polyols, taurine, or hypotaurine. Also can provide redox balance as is the case of glycerol, or even detoxify sulphide such as hypotaurine in the case of some piezophiles. Other compatible solutes stabilize macromolecules and counteract perturbation in non-interchangeable ways. In this way methylamines such as trimethylamine *N*-oxide can enhance protein folding and ligand binding and counteract perturbations by urea, inorganic ions, and hydrostatic pressure in deep-sea animals. There is a third group of compatible solutes that appear to be used in nature to counteract perturbants of macromolecules to avoid detrimental effect of some stresses (Yancey 2005).

Compatible solutes can be chemically ordered in different types: small carbohydrates including sugars (trehalose), polyols (glycerol, inositol, sorbitol) and derivatives (O-methyl-inositol), amino acids (glycine, proline, taurine) and derivatives (ectoin, hydroxyectoine), methylamines (trimethylamine *N*-oxide and glycine betaine) and methylsulfonio type solutes including dimethylsulfoniopropionate (Kempf and Bremer, 1998; Yancey, 2005).

Particularly, it has been established that several anhydrobionts can tolerate desiccation by intracellular accumulation of non-reducing disaccharides, such as trehalose and sucrose, which can represent up to 20% of their dry weight (Clegg, 2001; Crowe and

Introduction

Crowe, 1992). The accumulation of these two types of sugars has been described in drought-resistant cyanobacteria subjected to water stress (HersHKovitz et al., 1991). Trehalose is common in different groups of bacteria, fungi, nematodes, tardigrades, *Artemia salina*, lower plants (*Selaginella lepidophylla*) and in some angiosperms (*Myrothamum flabellifolium* and *Sporobolus atrovirens*) (Crowe, 1992a; Iturriaga et al., 2000), whereas sucrose has been described as the main xeroprotectant in higher plants, which can represent 50% of dry weight (Crowe et al., 1998). In general, trehalose appears to be present in microorganisms, lower plants and small animals, while sucrose is most often found in seeds and higher plants.

Although the accumulation of trehalose in high concentrations is common in several anhydrobionts, some of them present very small amounts (Westh and Ramlov, 1991) or none at all, as described for some rotifers and tardigrades (Hengherr et al., 2008; Tunnacliffe and Lapinski, 2003; Tunnacliffe et al., 2001). Thus, there might be an accumulation of other families of carbohydrates such as oligosaccharides derived from raffinose, with a role in the desiccation tolerance of many seeds (Hincha et al., 2003). On the other hand, the presence of extracellular polysaccharides is a feature of many bacteria, and it has been stated that it contributes to the stabilisation of cells during storage in the dry state (Potts, 2001), this mechanism has been described for cyanobacteria (Hill et al., 1997) and for some bacteria of the genus *Arthrobacter* (Narvaez-Reinaldo et al., 2010).

Compatible solutes can be obtained from microorganism in different ways. In order to obtain large amounts of compatible solutes (i.e. ectoin and hydroxyectoine) Galinski and coworkers developed a technology called bacterial milking. This technology is based on incubation of cells (i.e. *Halomonas elongata*) in hyperosmotic conditions followed by a transfer of the cells to a low osmolarity medium, resulting in the release of the accumulated compatible solutes in the medium (Sauer and Galinski, 1998).

Another bioprocess for obtaining ectoine with high productivity was developed recently. This process of 'permanent milking', with a continue fermentation of *H. elongata*, appears in figure 1. This bioprocess is being used by the biotechnology company called bitop AG (Lentzen and Schwarz, 2005).

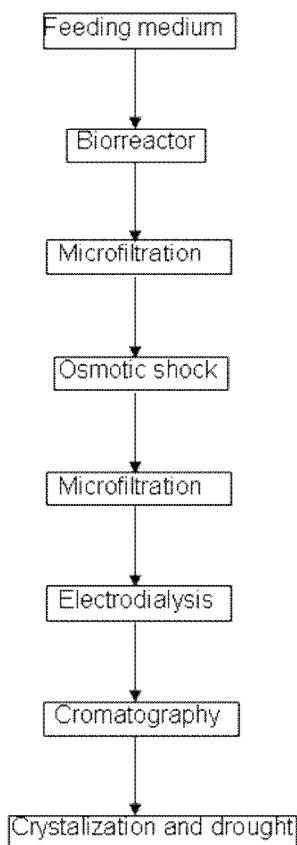


Figure 1 – Outline of the bioprocess for the production of ectoine. *H. elongate* is grown in a continuous fermenter, and biomass is removed by microfiltration. The concentrated biomass is exposed to low osmotic pressure and again concentrated by microfiltration. Ectoine obtained was purified by electro dialysis and chromatography processes. Finally, there is crystallization of the product (Schwarz, 2006).

3.2– Specialized proteins.

Proteins might be involved in the stabilisation of biomaterials in the dry state too. This has received much interest recently, since it has been noted that in some organisms, the production of compatible solutes is not enough for the stabilisation of the anhydrobiont in the dry state (Hengherr et al., 2008; Lapinski and Tunnacliffe, 2003).

Studies in some desiccation-tolerant microorganisms have shown that the intracellular glasses formed as a mechanism of desiccation tolerance, are likely to be a mixture of sugars and proteins. Among the different proteins that might be involved, LEA proteins (late embryogenesis abundant) are the most likely candidates to play this role (Crowe et al., 2005).

Introduction

Most of the LEA proteins belong to the best-characterized subset of the hydrophilins a subgroup of highly hydrophilic proteins produced by many anhydrobionts (Battaglia et al., 2008; Garay-Arroyo et al., 2000) in preparation for severe dehydration. Hydrophilins are part of a group of proteins that are defined by common physicochemical characteristics such as the high presence of Gly content (over a 6%), by the presence of small amino acids such as Ala and Ser and by presenting a high hydrophilicity index over 1 (Battaglia et al., 2008).

Other proteins involved in desiccation tolerance are anhydrins, highly hydrophilic proteins that lack significant secondary structure in the hydrated resembling LEA proteins and examples of the extensive group of intrinsically disordered proteins (IDPs) that therefore could share similar hypothetical functions (Boscheti et al., 2010; Browne et al., 2004; Tompa, 2009). Despite their disordered nature, IDPs are known to carry out a range of different, and sometimes multiple, functions (Tompa et al., 2005), and LEA proteins are not unusual in this respect. Thus, LEA proteins have been implicated as molecular shields or chaperones, membrane protectants, ion sinks, hydration buffers and antioxidants (Battaglia et al., 2008; Tunnacliffe and Wise, 2007; Tunnacliffe et al., 2010).

There are other proteins with antioxidant roles involved in desiccation tolerance since desiccation disrupts the function of electron transfer chains, thereby elevating levels of reactive oxygen species (ROS) which have a detrimental effect on cell components (Kranner and Birtic, 2005; Rizzo et al., 2010).

Also recent studies have shown the involvement of molecular chaperones such as small stress proteins like *Artemia* P26, Hsp 21 and Hsp 22 or p26 (Clegg, 2005; Clegg et al., 1994; Feder and Hofmann, 1999; Hand et al., 2011; Liang et al., 1997; Menze and Hand, 2009; Parsell and Lindquist, 1993; Willsie and Clegg, 2001). Presumably, these proteins provide resistance to water stress conditions by avoiding aggregation; however, the exact mechanism remains unclear.

Introduction

3.3 – Modification of the membrane.

The alteration in the lipid content of the membrane, is of great importance in response to environmental stress (Ritter, 1993). The maintenance of the membrane integrity in anhydrobiotic organisms is a central mechanism for their desiccation tolerance (Carpenter and Crowe, 1989; Crowe, 1992a). Besides the ability to preserve the integrity of proteins and enzyme activity, it has also been reported that trehalose can stabilize membranes (Crowe et al., 1987; Crowe, 1986; Crowe, 1992b; Leslie et al., 1994; Manzanera et al., 2004c; Vilchez et al., 2008). Dried membranes in absence of xeroprotectants suffer the fusion of their vesicles, changes in their morphology, and loss of their activity such as the ability for calcium ion transport (Crowe, 1992b).

Membranes remain functional in hydrated state because their phospholipids remain hydrated. In this way in the case of phosphatidylcholine between 10 and 12 water molecules are linked by hydrogen bonds around each phosphate group, representing about 20% of the membrane water content. When water is removed, the packaging of the lipidic head groups increases, which allows increasing the van der Waals forces between the linear hydrocarbon chains (Crowe, 1992b). As a result, the transition temperature, T_m , increases dramatically. Therefore dried lipids enter into a gel phase at room temperature. As a result, when dried lipids are rehydrated it can produce a new transition occurring in the 'leakage' in the membrane. Trehalose appears to attenuate the transition temperature, so when lipids are dried they are kept at the amorphous glass state (Crowe, 1992b; Leslie et al., 1994).

3.4 – Production of exopolysaccharide (EPS) and extracellular DNA (eDNA).

EPS layers are formed by accumulation of various types of high viscous polymeric substances, around the bacterial wall which usually present hygroscopic nature. In addition, EPS often contains more water than the surrounding environment alleviating the loss of water from the cells (Ernst, 1987; Potts, 1994a). The role of biofilm formation in desiccation tolerance has been studied in Gram-negative organisms such as the biofilm forming soil bacterium *Rhizobium leguminosarum* (Vanderlinde et al., 2010) and *Pseudomonas putida* (Chang et al., 2007) relate to the protective role of biofilm EPS. Vogel *et al.* (2010) demonstrated that cells of *Listeria monocytogenes* subjected to

Introduction

a previous method of osmoadaptation, increased their survival against a later desiccation process. This indicates an apparent protective effect of the biofilm formation, which may have been caused by an increase in desiccation resistance due to shift in cell metabolism, cell envelope composition and/or protective effect of the biofilm matrix or exopolymeric substances (EPS) (Hansen and Vogel, 2011). Other authors have suggested other explications, based on that properties presented by EPS presents to adopt a state of amorphous glass (Billi and Potts, 2001).

The amount and composition of EPS produced by bacteria varies among strains and depends on environmental factors such as temperature, nutrients, salt, etc. (Di Bonaventura et al., 2008; Djordjevic et al., 2002; Pan et al., 2010; Zameer et al., 2010). Recently it was reported that listerial EPS consist mainly of extracellular DNA (eDNA) and peptidoglycans including N-acetylglucosamine (Harmsen et al., 2010). Furthermore, the important structural role of extracellular DNA (eDNA) has been demonstrated in the biofilm of many bacterial species both Gram-negative such as *Pseudomonas aeruginosa* (Allensen-Holm et al., 2006; Whitchurch et al., 2002) and Gram-positive such as *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes* (Hall-Stoodley et al., 2008; Harmsen et al., 2010; Izano et al., 2008; Vilain et al., 2009). Many studies support the hypothesis concerning the involvement of the eDNA in providing nutrition and energy for sessile cells (Finkel and Kolter, 2001; Mulcahy et al., 2010) maintaining the three-dimensional biofilm structure and promoting horizontal gene transfer in naturally competent cells (Molin, 2003; Spoering and Gilmore, 2006). In addition, bacterial eDNA (present as a component of the biofilm EPS) is involved in essential functions such as initial adhesion, aggregation of cells, and cohesion of biofilms to provide mechanical stability. Furthermore some authors have suggested a role for that eDNA in EPS to protect the cell from environmental stresses, such as the presence of contaminants. In these regard, Li et al. (2012) suggest that eDNA, might act protecting to chlorohexidins from accessing biofilm cells (Li et al., 2012). The role of eDNA in these developmental processes can be largely developed in combination with other components present in EPS such as polysaccharides, proteins, and amphiphilic molecules (Harmsen et al., 2010).

Introduction

One mechanism of eDNA release seems to be bacterial cell lysis, as has been shown for *P. aeruginosa* and *S. aureus*, where eDNA release is also associated with the release of intracellular proteins (Allensen-Holm et al., 2006; Rice, 2007). On the other hand, a type of secretion system specific for chromosomal DNA was found to be encoded on a pathogenicity island in *Neisseria gonorrhoeae*. This indicates that eDNA can be generated by several mechanisms and is not exclusively explained by cell lysis (Hamilton et al., 2005). Praveen et al. (2012) suggested the origin of eDNA in bacterial EPS in *Acinetobacter baumannii* eDNA was attributed to three major processes: (a) active release of eDNA in free form, (b) encapsulation of eDNA by membrane vesicles released (early growth stages), and (c) passive release of eDNA during cell lysis (later stages of growth).

(a) eDNA at early stages indicates active release of DNA which is independent of lysis. Autolysin-mediated eDNA release and biofilm formation is shown in *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* (Praveen et al., 2012). Some studies have suggested that the interplay of 2 secreted and coregulated proteases, GeE and SprE, is responsible for regulating the autolysis and release of eDNA (Li et al., 2012).

(b) Membrane vesicles are released during in vitro growth of *A. baumannii*, according to recent studies (Jin et al., 2011; Kwon et al., 2009). Vesicular DNA has been reported to be amplifiable in case of other Gram-negative bacteria (Dorward and Garon, 1990) such as *Escherichia coli* O157:H7 (Yaron et al., 2000) and *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Renelli et al., 2004).

(c) High concentration of eDNA at later stages of growth can be attributed to cell lysis leading to passive release of DNA into the extracellular medium (Praveen et al., 2012). eDNA contains DNA fragments of a size that has the potential to transfer genomic information. eDNA production could serve as an important environmental signal that facilitates species evolution by transfer of genetic information and an increase in the mutation rate. Recently it has been showed that *Streptococcus mitis* biofilms are able to take up and incorporate a chromosomal tetracycline resistance marker into their chromosomes (Itzek et al., 2011).

Introduction

3.5 – Other physiological mechanisms.

It is known that cells in stationary phase are structurally, physiologically and functionally distinct from those which are in logarithmic phase. Thus, it had been concluded that cells of *E. coli* in stationary phase show an increased resistance to desiccation, and expressed certain genes in response to osmotic stress which also appear to be involved in the adaptation to growth in the stationary phase (Garcia De Castro et al., 2000; Siegele and Kolter, 1992). Table 2 shows in summary the main adaptive strategies against desiccation. The decrease in overall translation activity occurring with the transition from exponential to stationary phase growth is accompanied by the appearance of ribosomes. In addition cells become smaller, spherical and hydrophobic with the aim to reduce the superficial area expose to desiccation. On the other hand, the explanation of the conversion of unsaturated fatty acids derived from cyclopropane is unclear. This effect has been observed in natural environment but has not been duplicated in the laboratory. Moreover, protein synthesise is related to increase the microbial tolerance to desiccation stress (Siegele and Kolter, 1992; Potts, 1994).

Table 2 – Transition characteristics of the log phase to the stationary phase (changes related to resistance to desiccation) (Potts, 1994a).

Physiological target	Consequence
Cellular morfology	Cells become smaller (mostly spherical) and hydrophobic; cytoplasm condensate; increased periplasmic volume
Fatty acid composition	Conversion of all unsaturated fatty acids derived from cyclopropane
Metabolic rate	Descent, and variations in pH and osmotic potential contribute to changes in membrane proton pump; increased synthesis of trehalose in response to the lack of C (osmotic changes), lack of specific thermotolerance and osmoprotection induced
Proteins	Increase in fivefold in workload, proteolysis increased, 30-50 new proteins are synthesized, expression of catalase, HP11
Ribosomes	Dimerization
Spontaneous mutation rate	Increase

Introduction

4 – Protection hypothesis of compatible solutes.

Currently, three hypotheses have been proposed to explain how xeroprotectants synthesised by these anhydrobiont organisms may protect them from drying:

4.1 - Water replacement hypothesis

Assuming that the adaptive mechanism may be similar in all organisms at the cellular and molecular level, one of the plausible mechanisms of adaptation involves the hypothesis of replacement of water loss by a xeroprotectant (Clegg et al., 1982).

According to this hypothesis, xeroprotectants (i.e glycerol, trehalose or sucrose) are usually polyhydroxylated compounds whose hydroxyl groups could form hydrogen bridge bonds to phospholipids and membrane proteins, thus avoiding merging of lipids, and inhibition of protein by denaturation. These compounds also could replace the loss of water around the polar residues of the macromolecules, and this might be the mechanism by which they would maintain the native conformation of proteins (Crowe et al., 1998). Figure 2 shows this hypothesis.

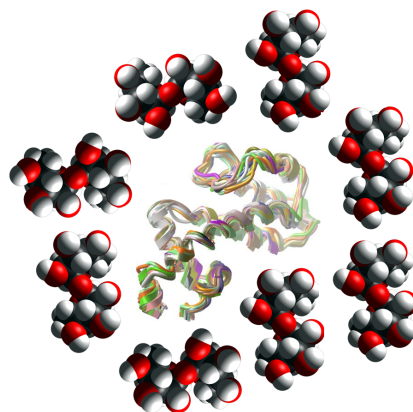


Figure 2 – Water replacement hypothesis. Molecules of compatible solutes establish hydrogen bonds directly with the protein, creating a hydrated state without water.

Membranes are considered a primary target of dehydration injury. Some disaccharides can prevent fusion and loss of membrane integrity associated with dehydration in natural and model membranes (Crowe et al, 1984; Crowe et al, 1992; Crowe et al, 1998). That is to say, the drying resistance involves the replacement of water at the

Introduction

macromolecular and ultrastructural level by polyhydroxy compounds. This hypothesis is based on experiments on embryos of *Artemia salina* (Clegg et al., 1982) and others that describe the accumulation of high concentrations of these compounds in several desiccation-resistant cells (Crowe et al., 1984; Crowe et al., 1992; Crowe, 2002; Hershkovitz et al., 1991). Although there are strong arguments in favour of water replacement some works by the Bryant's group have shown that some sugars are excluded from dry bilayers questioning the validity of the water replacement hypothesis (Koster et al., 2003; Lenne et al., 2006). Despite the controversy on these studies, Golovina and coworkers used molecular-dynamics simulations to investigate the influence of trehalose on the area per lipid and related structural properties of dehydrated bilayers in atomic detail with different degrees of dehydration and different molar trehalose/lipid ratios showing the validity of this hypothesis (Golovina et al., 2009). In this regards, similar conclusions were reached by Watanabe and coworkers using larvae of an African chironomid, *Polypedilum vanderplanki* as a model. These larvae live in temporal rock pools, and when the pools are completely dry up the larvae dehydrated and undergo anhydrobiosis until the next rain comes. During this dehydration process, larvae accumulate large amounts of trehalose, which provides effective protection against desiccation because of its high capacity for water replacement as these authors stated (Watanabe, 2003). This group used differential scanning calorimetry measurements and FTIR analyses indicating that the anhydrobiotic larvae were in a glassy state up to as high as 65°C. Changing from the glassy to the rubbery state by either heating or allowing slight moisture uptake greatly decreased the survival rate of dehydrated larvae. In addition, FTIR spectra showed that sugars formed hydrogen bonds with phospholipids and that membranes remained in the liquid-crystalline state in the anhydrobiotic larvae. These results indicate that larvae of *P. vanderplanki* survive extreme dehydration by replacing the normal intracellular medium with a biological glass. Similar studies with similar conclusions were obtained by the Hengherr's group using the crustaceans *Triops* and *Daphnia* (Hengherr et al., 2011).

4.2 - Glass formation hypothesis

Nearly a decade ago, an alternative view was proposed, by virtue of the ability of sugars, which are involved in stabilising anhydrobionts organisms, to form amorphous glasses, a process called vitrification (Crowe et al., 1998; Crowe, 2002).

Introduction

Vitrification is the solidification of a liquid without crystallisation. The resulting amorphous glass retains the random molecular arrangement of a liquid, but it has the mechanical properties of a solid (Taylor et al., 2004). These crystals are highly viscous amorphous solids, in which the mobility of the components is very restricted, molecular diffusion is reduced and harmful chemical reactions (Maillard reaction) and physical damaging events, such as the melting and the glasses formation, are prevented, which would otherwise be detrimental during prolonged desiccation (Billi and Potts, 2002; Crowe, 2002; Sun and Leopold, 1997). Figure 3 shows this hypothesis.

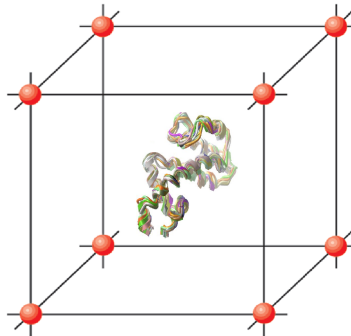


Figure 3 – Glass formation hypothesis. Under intensive drought conditions compatible solutes develop a glass state where the protein establishes hydrogen bonds with xeroprotectants constituent of the glass.

The main sugars considered as good glass formers are trehalose and sucrose (Crowe et al., 1998; Crowe, 2002). It has been proposed that trehalose can protect membrane systems during drying to form a stable inert glass that protects proteins and lipids. Also, it has been observed that some bacteria produce extracellular polysaccharides (EPS) that have different properties and may indeed have properties similar to those described for the formation of amorphous glasses (Billi and Potts, 2002; Potts, 1994).

On the other hand, it has been proposed that the formation of amorphous glass is not mutually exclusive with the water replacement hypothesis (Clegg, 2001; Crowe et al., 1998). In fact, it has been shown that vitrification is often necessary for stabilisation of biomolecules in the dry state, but insufficient by itself (Potts, 2001).

On this basis, it is recognised that these two biophysical mechanisms may be involved in protecting anhydrobiotic organisms. One relates to the protective effect of polyhydroxy compounds (carbohydrates and other compatible solutes) by direct interaction with membranes and macromolecules or by water replacement. The other

Introduction

concerns the role of carbohydrates in the vitrification of the cytoplasm that could preserve biological structures by immobilisation during cellular dehydration (Clegg, 2001; Sun and Leopold, 1997).

4.2.1 - Maillard reactions (browning)

Maillard reactions are the reactions that occur between reducing sugars and proteins and nucleic acids in the dry state, with the formation of dark brown products, originally known as melanoidins, which are considered as a major source of damage, and it has been indicated that they could contribute to the modification of nucleic acids and proteins during dry storage (Crowe et al., 2001; Crowe et al., 2005; Potts, 2001).

As sucrose and trehalose are not reducing sugars, this could explain, in part, why they are the usual accumulated products by anhydrobiont organisms (Crowe et al., 2001; Crowe et al., 2005). However, the glycosidic bonds of sucrose and trehalose have different susceptibilities to hydrolysis (Crowe et al., 2005). Different assays have shown that the rate of browning of sucrose is close to glucose and even 2000 times faster than with trehalose (Crowe et al., 2001). These observations strongly suggest that the browning observed with sucrose but not trehalose is due to glycosidic bond hydrolysis during storage. In addition, the glass formed by trehalose is not hygroscopic, whereas the sucrose glass is highly hygroscopic. Figure 4 summarizes the chemical routes for the production of Maillard reactions (Nursten, 1980).

Introduction

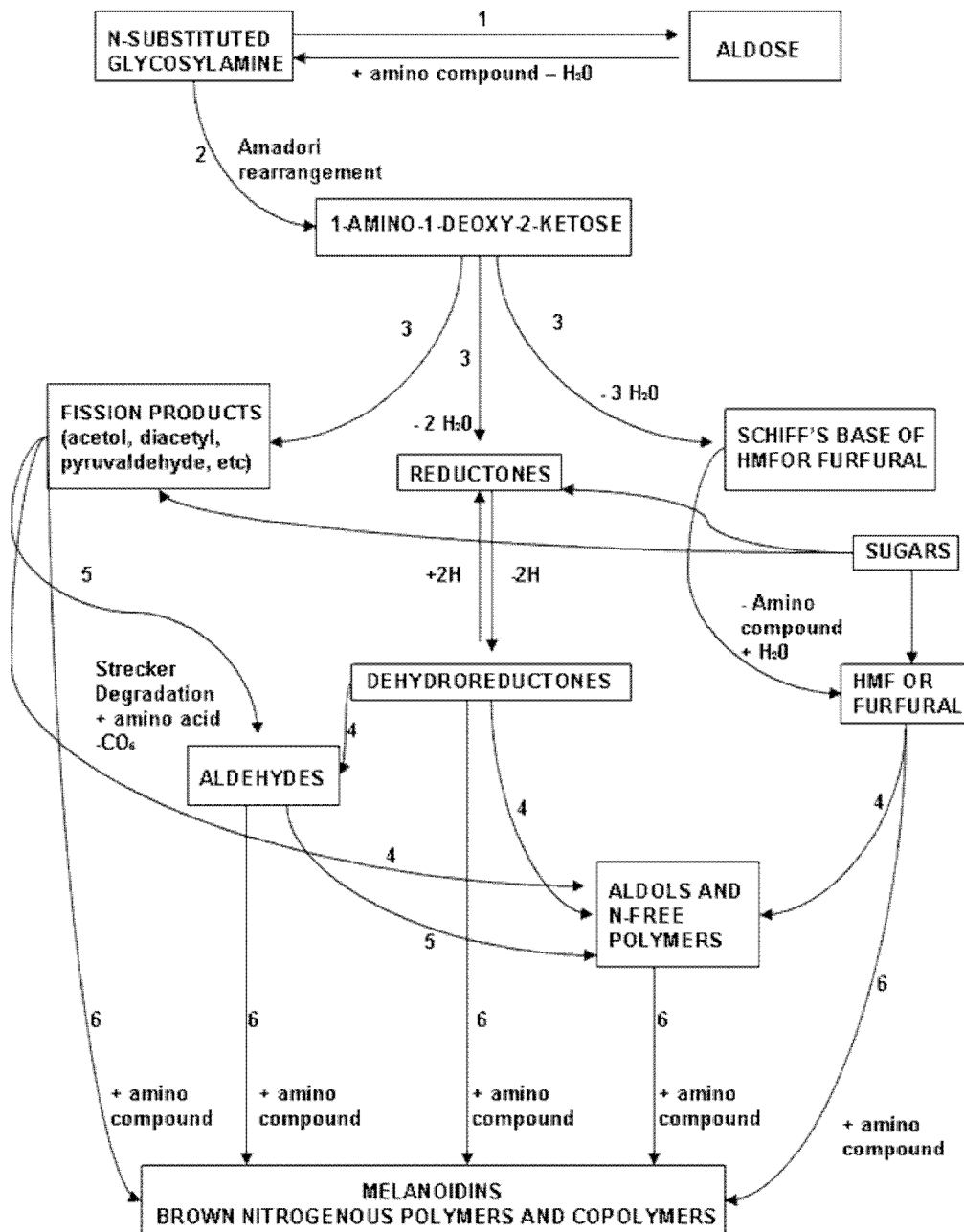


Figure 4 – Chemical routes to produce Maillard reactions. First at all comprises glycosylamine formation (1) and subsequent rearrangement. The intermediate stage comprises dehydration (3), with loss of three or two water molecules; fission, mainly by dealdolisation; and Strecker degradation (5), the interaction of amino acids and carbonyl compounds, which produce dehydroreductones or dehydration or fission products. The final stage step consist of the transformation of carbonyl compounds, such as furfurals, fission products, dehydroreductones or Strecker aldehydes, into high molecular weight products, the melanoidins, with further involvement of amines where these are available.

4.3 - Water-entrapment hypothesis

Therefore if the water replacement hypothesis, proposes that the stabilization of biomaterial occurs via the formation of hydrogen bonds between the sugar and the biostructure and the vitrification hypothesis proposes that is the high viscosity what

Introduction

causes a motional inhibition and hindering of processes leading to loss of structure and denaturation, there is a third hypothesis called the water-entrapment hypothesis that proposes that sugars concentrate residual water molecules close to the surface of the biomolecule (figure 5), in this way the biomolecule preserves its solvation and native properties to a large extent (Potts, 1994a).

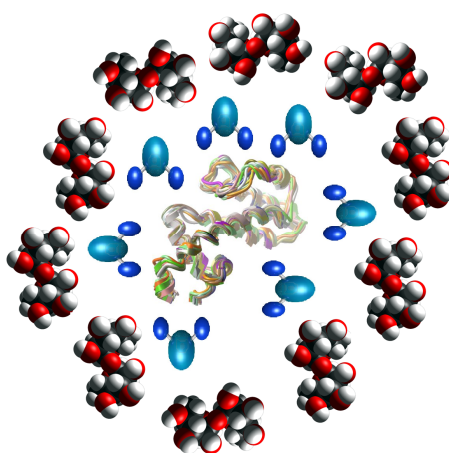


Figure 5 – Water entrapment hypothesis. Xeroprotectants create a cover around the protein with residual molecules of water which establishes hydrogen bonds with the protein.

The above hypotheses are not mutually exclusive. In this way the formation of a glassy state does not imply hydrogen bonding, as Allison and coworkers showed with their observation of the failure of dextran to inhibit dehydration-induced lysozyme unfolding resulting from the inability of the polymer to hydrogen bond adequately to the protein (Allison, 1999). On the other hand the effectiveness of trehalose in preservation may be due to the ability of forming glassy structures in a wide hydration range, along with the hydrogen bond capability. However, this is not consistent with results on raffinose, which is less effective than other sugars when FTIR was used to study glasses of pure carbohydrates in the cytoplasm of desiccation tolerant plant organs (Wolkers et al., 1998). In this sense Cordone et al. evidenced that while the protein-sugar interaction was well described in terms of a *water entrapment* hypothesis, the *water replacement* hypothesis was more adequate for sugar-membrane interactions (Cordone et al., 2007).

5 - Biotechnological applications in preserving biomaterials

Studies in anhydrobiotic organisms established some of the main mechanisms that allow them to survive dehydration (Crowe et al., 1992). Understanding these mechanisms has many uses, not only because it can solve a major problem in cell biology, but also because the elucidation of how organisms escape irreversible damage caused by dehydration can contribute to the understanding of the importance of water in maintaining the structural and functional integrity of membranes and fully hydrated cells (Crowe et al., 1987). It also has applications from the viewpoint of biotechnology, opening up a whole field of research that seeks to develop new methods for preserving biological materials that are normally sensitive to desiccation in what is known as anhydrobiotic engineering (Billi and Potts, 2002; Crowe et al., 1992; De Castro et al., 2000a).

Recently, it has become increasingly evident that trehalose alone is insufficient to induce protection against anhydrobiosis (Hengherr et al., 2008; Hengherr et al., 2011; Lapinski and Tunnacliffe, 2003; Rebecchi et al., 2007). Therefore, it is necessary to search for new xeroprotectants that can be used to preserve a wide variety of desiccation-sensitive products, such as biomolecules, vaccines, mammalian cells or tissues (Manzanera, 2002).

All biological materials are subject to deterioration with time and this process is an inevitable physical phenomenon. The preservation of labile biological products such as proteins, vaccines, blood or other types of cells and tissues, have useful applications in biology, biochemistry, pharmacy, medicine and nutrition (Miller et al., 1998). Here we also review the preservation of biomaterial at four different levels including biomolecule, cell, tissue, organs and whole organisms.

5.1 - Preservation of biomolecules

Biomolecules such as proteins, enzymes, hormones, etc. are generally unstable when kept in aqueous solutions at room temperature and in a few hours it can be observed some degradation, denaturation and/or growth of microbial contaminants (Arakawa et al., 2007a; Hajare et al., 2009). To avoid these effects different methods of preservation

Introduction

could be used with great interest for the pharmaceutical, biotechnology and food industry (Conrad et al., 2000). Here we present the most common techniques used to preserve these biomolecules:

5.1.1 - Addition of stabilising agents

Stabilising agents are inert substances that modify the physicochemical properties of aqueous solutions used to preserve biomolecules. These molecules reduce the damage caused by the different methods of conservation (frozen and/or dehydration), such as the denaturation of proteins (Wang, 2000).

These stabilising agents may consist on sugars (glucose, lactose, sucrose, trehalose), polyols (glycerol, sorbitol, mannitol), polyethylene glycol, amino acids (methionine, histidine), surfactants (Triton X-100, Tween-20), salts, and other proteins (albumin) (Arakawa et al., 1993; Arakawa et al., 2007b; Carpenter et al., 1987; Crowe, 1992b; Tang and Pikal, 2005; Wang, 2000). Glycerol is the stabilising agent (cryoprotectant) traditionally used to reduce the freezing point of the aqueous solution and increases the total solute concentration, allowing the preservation of biomolecules in a semi-liquid state at low temperatures (-20°C to -80°C) without being frozen, which gives greater structural stability to proteins (Lovelock and Polge, 1954; Vagenende et al., 2009). The stabilising agents are often used jointly with other conservation methods.

5.1.2 - Storage at low temperature

Commonly, proteins or other biomolecules in aqueous solution are kept at refrigerated temperatures, in liquid state at 4°C or frozen state at -20°C. This reduces the degradation reactions. However, the process of repeated freezing and thawing causes changes in the structure and/or activity of these compounds (Lovelock and Polge, 1954; Vagenende et al., 2009). Nevertheless, this conservation method does not avoid the appearance of degradation, denaturation and/or microbial contamination and, in addition, low temperatures cause damage to labile biomolecules, and there is a need to maintain the cold chain when transportation is required (Hajare et al., 2009; Tang and Pikal, 2005).

Introduction

5.1.3 – Lyophilisation

Freeze-drying is generally used to stabilise protein products that are not stable enough to be stored in aqueous solutions over extended periods of time. This process involves two steps: freezing a protein solution, and drying it under vacuum. The drying process is also divided into two phases, known as primary and secondary drying. The primary drying removes the frozen water by sublimation and the secondary drying removes the unfrozen bound water (Arakawa et al., 1993). The result of the lyophilisation process is a dry and crystalline powder, which contains the biomolecule of interest (Wang, 2000).

However, this process generates a variety of freezing and dehydration stresses. The most critical stresses when protein is exposed at low temperatures are freezing, ice crystal formation, increased concentration of solutes and changes in pH, whereas during dehydration the greatest stress that they must endure is the loss of hydration water bound to the protein. Although these factors individually may not damage the biomolecule, the combination of them can be very destructive, reflecting the denaturation of proteins, and it may end in an irreversible loss of biological activity. Additionally, the products obtained after lyophilisation, usually, are very hygroscopic, which also causes degradation and decreased activity of these biomolecules (Arakawa et al., 1993; Wang, 2000). To prevent or mitigate the damage, stabilising agents are used, including sugars, amino acids and surfactants (Arakawa et al., 2007; Wang, 2000).

Today, stable storage and transportation of biomolecules, especially proteins, is a major challenge. In traditional methods several disadvantages have been reviewed during the storage process, which directly affect the structure and activity of proteins (Arakawa et al., 1993; Wang, 2000). In addition, the most common transport system for exchanging biomolecules of health interest, or for use in diagnostics, pharmaceuticals, agronomics, industry or research among laboratories within the same country or different countries, is based on the maintenance of the cold chain (dry ice, ice or cold packs) to ensure the preservation of the biomolecules during the time of transport. However, these systems are complex and involve a high cost. In addition, any delay in transport time may cause the loss of the cold chain and by the time this material reaches its destination it can be found at room temperature (Han et al., 2005). Therefore many studies are underway to

Introduction

develop methods to solve the problem of storage and transport, mainly for proteins, where anhydrobiotic engineering offers many advantages.

In the last decades it has been reported that proteins, liposomes and biological membranes can be stabilised in the dry state in the presence of certain sugars, which are found in high concentrations in many anhydrobiotic organisms (Crowe, 2002). Since then, drying trials were conducted on dehydration-sensitive enzymes such as phosphofructokinase (Carpenter et al., 1987) and lactate dehydrogenase (Miller et al., 1998), finding that they can mainly be stabilised in the presence of trehalose. However, it is worth noting that maltose and sucrose have been tested as well with good results in the preservation of enzymes (Carpenter et al., 1987). In addition, it has been suggested that sugars may increase the temperature of thermal denaturation of dried proteins (Crowe and Crowe, 1992).

Other tests performed at the level of the cell membrane have shown that certain sugars such as trehalose and sucrose are able to prevent damage caused by dehydration, not only by inhibiting fusion between adjacent layers, but also by the maintenance of a fluid phase of lipids in the absence of water during drying, being better stabilised in the presence of trehalose (Crowe et al., 1983; Crowe et al., 1984; Crowe et al., 1987; Crowe et al., 2005). It has been suggested that trehalose and membrane lipids such as dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) interact through hydrogen bonding between hydroxyl groups of carbohydrates and the polar groups of DPPC (Crowe et al., 1984). Note also that preserving lyophilised membranes in sucrose presented as good results as when trehalose was used. However, the use of sucrose requires much higher concentration of this sugar to achieve the same level of stabilisation (Crowe et al., 1987). It has also been reported that other compounds such as proline and betaine can stabilise cell membranes (Rudolph et al., 1986).

Some glycans produced by cyanobacteria have been tested for the stabilisation of membranes. It was found that the addition of these glycans inhibited the fusion of the layers of the membrane during drying and freeze drying protocols (Hill et al., 1997). In this sense it has also been reported that a series of oligosaccharides of the raffinose family are able to stabilise liposomes in the dry state (Hincha et al., 2003). The effects of these molecules in stabilising the membrane proteins are important for the survival of

Introduction

intact cells and organisms with important applications in biology and medicine (Billi and Potts, 2002; Crowe et al., 1987).

On the other hand, hydrophilins from plants, bacteria and yeast have been used for the stabilization of enzymes such as malate dehydrogenase and lactate dehydrogenase, with better results than trehalose using the equivalent molar concentration (Reyes et al., 2005). A similar study was conducted with two hydrophilins from nematode and wheat (*Triticum aestivum*) and with a recombinant version of wheat Em protein, a group 1 LEA, and were found to prevent the enzyme aggregation under desiccation and freezing stress (Goyal et al., 2005).

5.1.4 - Air Drying

Air drying has been proposed in some cases to preserve proteins for long periods at ambient temperature without significant loss of activity in. They clearly indicated and confirmed that the stability of sensitive biomolecules dried by evaporative drying is better than that of freeze-dried samples. However, dehydrated solutions with protectants obtained by evaporative drying are very viscous and too much time is required for their evaporation as it is a diffusion-limited process; hence the process is non-scalable and unsuitable for industrial applications (Hajare et al., 2009).

5.2 - Preservation of cells

5.2.1 - Prokaryotic cells

Correct maintenance of microbial cultures is essential for some research and industrial activities. Thus, valuable strains must be stored for long periods of time, requiring effective conservation methods to ensure cell viability and genetic stability (Broadbent and Lin, 1999; Goldman and Green, 2009; Sandine, 1996).

Here we describe the most commonly used methods to preserve prokaryotic cells.

Introduction

5.2.1.1 - Cryopreservation

Cryopreservation is a common technique of preserving structure and function of cells and tissues at low temperatures, where biochemical and metabolic reactions are very slowed down. Cryopreservation usually involves the use of one or more components that provide protection to cells during freezing, otherwise freezing would be lethal. These components are called cryoprotectants and are very simple molecules with low molecular weight, which are highly soluble in water and present low or no toxicity. A common feature among these components is their ability to interact with water through hydrogen bonds (Mullen and Critser, 2007; Pegg, 2007).

The most commonly used cryoprotectants for the storage of microorganisms include glycerol, dimethyl sulfoxide, methanol, ethylene glycol, propylene glycol and serum albumin stored for long periods of time, mainly in liquid nitrogen (-196°C) or refrigeration below -80°C (Hubalek, 2003).

This method is considered the best for maintaining cell viability in some respects, but presents the disadvantage of requiring special and expensive equipment, and requires the maintenance of a stable low temperature (Benson, 2008; Hubalek, 2003).

5.2.1.2 - Freeze-drying

Freeze-drying is considered the most suitable method for the preservation of microorganisms for long periods of time (Morgan et al., 2006). This technique involves freezing a culture followed by vacuum drying as described in the section on biomolecules. In addition, the used culture medium is an important factor in the process of freeze-drying in order to provide maximum stability. Among the recommended agents are skim milk, horse serum, yeast extract and foetal bovine serum (Goldman and Green, 2009).

The advantage of this method is that the culture can be easily maintained at room temperature without complete loss of survival. However, a major cause of loss of cell viability is the need to freeze the sample. The damage caused by the freezing process and especially the freezing rate can be detrimental to the bacterial cell viability after

Introduction

drying (Morgan et al., 2006). Other disadvantages include the risk of cross contamination, the limited volume that can be kept in containers for freezing, the possible requirement to establish a specific methodology for some microorganisms, the high cost of equipment, and the high energy costs and time consumption of the process (Han et al., 2005; Morgan et al., 2006).

5.2.1.3 – Vacuum drying

Vacuum drying is a modification of lyophilisation in absence of the freezing step. Vacuum drying has been applied to preserve biomolecules in presence of xeroprotectants. Upon drying, the biomolecule is embedded in the xeroprotectant adopting an amorphous glass. There have been several studies describing the use of disaccharides as protective agents against this type of drying for the preservation of different types of bacteria. Thus, the successful use of trehalose in the stabilisation of *Lactobacillus acidophilus* (Conrad et al., 2000), *Escherichia coli* (Billi et al., 2000; Israeli et al., 1993) and *Pseudomonas putida* (De Castro et al., 2000a) has been described. However, others xeroprotectants, such as ectoine or hydroxyectoine have been described with better results than trehalose in the dry state for stabilising *P. putida* (Manzanera, 2002) and *E. coli* (Manzanera et al., 2004b).

Manzanera et al. (2002) have developed a new technique to provide plant growth promoting bacteria (PGPR) attached to seeds, based on vacuum drying preservation. Once dried in presence of xeroprotectants such as ectoine, hydroxyectoine or trehalose, these microbes can tolerate a treatment with organic solvents without detrimental effect. In addition, and thanks to this newly described tolerance, they can also be encapsulated with plastics such as polystyrene (Vilchez and Manzanera, 2011; Vilchez et al., 2008). They applied this approach to encapsulate dried bacteria in corn seed, maintaining the viability of the cells for extended periods of time (Manzanera et al., 2004c). Once that seeds were sown the presence of water facilitated seed germination, followed by the breakdown of plastic capsules, releasing the PGPRs which resumed their metabolism and colonized the roots of the plant (Manzanera et al., 2010).

Introduction

However, from all these studies we may conclude that a xeroprotectant that works efficiently for a specific cell may not necessarily reach the same level of stabilisation with other types of cells.

5.2.2 - Eukaryotic cells

With recent advances in tissue engineering, cell transplantation, and genetic engineering, living cells are becoming an important therapeutic tool in clinical medicine. Thus, there is the need to develop time efficient and low cost strategies for the long-term storage of mammalian cells (Buchanan et al., ; Eroglu et al., 2000).

The term “biopreservation” has recently been introduced as the storage process for the conservation of the integrity and functionality of cells outside of their natural environment. Thus, the best-known biopreservation approach is cryopreservation (Scott et al., 2005).

5.2.2.1 - Cryopreservation

Cryopreservation is the only currently established method that maintains the biological function and allows long-term storage of a variety of mammalian cells (Chen et al., 2001; Eroglu et al., 2000). There are two basic approaches to cryopreservation: one involves a classic technique of controlled freezing and the other is based on vitrification. Although these techniques are fundamentally different, both require storage at cryogenic temperatures (generally below -80°C) (Fahy et al., 2004).

The cryoprotectants used in such methods need to be biologically acceptable, must penetrate into cells and should have low or no toxicity. Many compounds present these properties, including glycerol, dimethyl sulfoxide, ethanediol and propanediol (Pegg, 2007).

5.2.2.2 - Xeropreservation

Vitrification is an alternative to cryopreservation and involves the solidification of the liquid without crystallisation (Benson, 2008). The benefit of this approach is that the

Introduction

damage due to intracellular ice formation can be avoided. Unfortunately, other types of damage are more likely, because they need solutions with high concentrations of cryoprotectants, which sometimes turn out to be toxic and impractical (Mullen and Critser, 2007; Pegg, 2007).

The dry storage at room temperature that we termed as *xeropreservation* may be an alternative and more flexible strategy for the long-term preservation of mammalian cells with several advantages over cryopreservation such as storage at room temperature, simplifying the requirements for distribution and storage, no need for a constant supply of energy to precisely control the temperature, ease of transportation and handling, and no use of toxic protectors (Eroglu et al., 2000; Nakahara et al., 2010).

The possibility of stabilising mammalian cells in a dry state presents great interest for a wide variety of biomedical and biotechnological applications (Billi and Potts, 2002; Han et al., 2005) in the fields of tissue engineering, cell transplantation, drug development and cell-based biosensors (Ma et al., 2005). It also has a strong commercial interest, as the world market invests millions of dollars in the stabilisation of the cells and cell products (Potts et al., 2005).

To achieve these goals several projects have been carried out, mainly using trehalose and other small carbohydrates as xeroprotectant agents (Chen et al., 2001). Some results have been encouraging, since it has been possible to activate mouse oocytes using freeze-dried sperm (Wakayama and Yanagimachi, 1998) and dried sheep lymphocytes (Loi et al., 2008). More recently dry preservation has been explored using a high-capacity trehalose transporter (TRET1) from the African chironomid *Polypedilum vanderplanki* (Kikawada et al., 2007) to introduce trehalose into the cytoplasm of mammalian cells and thereby increase desiccation tolerance. Chakraborty and coworkers used chinese hamster ovary cells (CHO) that were stably transfected with TRET1 (CHO-TRET1 cells) and incubated with high concentration of trehalose. An increase in trehalose uptake was observed in CHO-TRET1 cells compared to the wild-type CHO cells. Following trehalose loading, these researchers investigated desiccation tolerance by evaporative drying of cells showing a beneficial effect of intracellular trehalose for imparting tolerance to partial desiccation (Chakraborty et al., 2012). On the other hand, the stabilisation of enucleated cells such as erythrocytes and platelets

Introduction

lyophilised in the presence of trehalose, that are supposed to maintain their metabolic activities after rehydration, have been reported (Han et al., 2005; Wolkers et al., 2001).

Therefore, a method for stable drying of eukaryotic cells has not been conclusively demonstrated, only stabilisation during the initial stages of dehydration (Crowe et al., 2005; De Castro et al., 2000b; Tunnacliffe et al., 2001), and it seems to require a specific method and specific xeroprotectant for each type of cell.

5.3 - Preservation of tissues and organs

The demand for an effective method of biopreservation of tissues and organs continues to increase with the progress of research in the field of tissue engineering and regenerative medicine. Thus, it is important to have effective conservation methods to ensure a supply of cells, tissues and organs of higher quality and to stabilise natural and artificial tissues that allow their transport and longer useful life (Mullen and Critser, 2007; Taylor et al., 2004).

Medical advances in the field of transplantation have markedly increased in recent years. Initially, research focused on solid organ transplantation (kidney, liver, heart) and bone marrow transplantation. Subsequently, finding functionality in specific tissues for donation such as skin, muscle, cornea, etc. after stable drying would be of great interest. Furthermore there are xeroprotectants as mannitol, raffinose and trehalose, which are used in solutions for the preservation of organs and tissues at low temperatures. These xeroprotectants attenuate possible symptoms of hypoxia in the organs and maintaining stable redox potential for reduction of thermal excitation of the molecules, due to increased van der Waals forces and hydrogen bonds (Guibert et al., 2011).

Therefore there is a need to find a preservation system that maintains the viability of the grafts for more than 6 months to meet the constant demand generated by the clinical problems that require human skin grafts that has increased in recent years (Bondoc and Burke, 1971).

In this context, several investigations are underway in search of a method of preservation to maintain the structural and functional integrity of tissues and organs.

Introduction

Drying and vitrification in combination has been tested in the preservation of cardiovascular tissue matrix and skin, but not for the preservation of living cells (Taylor et al., 2004). However, studies in other tissues have shown that after drying of some organs of *Polypedilum vanderplanki* larvae, including fat, testes, nerves and dorsal vessels in the presence of trehalose, a proportion of cells are able to tolerate desiccation (Nakahara et al., 2010), but still deeper research is needed in this area to improve anhydrobiotic organ storage.

On the other hand, xeroprotectants have been used to preserve whole organisms. Some examples can be found among plants. Many programs for the conservation of forest trees, have focused their efforts on the cryopreservation of somatic embryos of conifers (Bomal and Tremblay, 2000). This has been developed by vitrification protocols with the xeroprotectant sucrose, obtaining good results on chestnut (Corredoira et al., 2004), *Quercus robur* (Chmielarz et al., 2005) and *Q. suber* (Fernandes et al., 2008; Valladares et al., 2004).

6 – Xeroprotection of crops by anhydrobiotic bacteria.

Certain rhizobacteria have the ability to increase the viability and health of host plants. They do it even in unfavorable conditions of cold, high salinity and drought. These microorganisms are called plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) (Bashan et al., 2004; Vilchez and Manzanera, 2011).

6.1 – Plant Growth Promoting Rhizobacteria.

PGPR are free-living bacteria that have a positive effect on the development of crops. They improve crops growth and health, prevent diseases caused by other microbes and facilitate the availability of nutrients for assimilation. Therefore, the presence of PGPR is translated into increases of the productivity and agricultural fertility reducing the negative impact of chemical fertilizers in the environment. PGPR can be found in the rhizosphere, this being the area under the influence of the roots. The PGPR offset the reduction in plant growth caused by pathogenic infections (Babalola et al., 2007), drought (Zahir et al., 2008), pollutants (Kumar et al., 2009), salt stress (Kumar et al., 2009) and other environmental conditions. A soil is fertile when microbes release

Introduction

organic and inorganic nutrients to sustain plant growth. PGPR can be found among several bacterial genera including *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Axospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Derrxia*, *Enterobacter*, *Glucanacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* and *Zooglea* (Babalola, 2010).

Different mechanisms are used by PGPR to stimulate crop growth including production of phytohormones, regulation of the production of ethylene in roots, nitrogen fixation, solubilisation of phosphates and production of bacterial siderophores.

Phytohormones are bioactive endogenous substances present in plants which control different processes of the plant growth. Phytohormone production by PGPR is one of the main factors for the improvement of the plant growth (Torres-Rubio et al., 2000), increasing the number and the size of root hairs and the weight of the roots which promote the uptake of soil nutrients and water by plants (Nelson, 2004). There are different kinds of phytohormones including gibberellin, cytokinins and auxins. Gibberellins increase the germination rate, tissue division, flowering and fruit development (MacMillan, 2002). Cytokinins promote transpiration and stomatal opening in many plants (Davies and Zhang, 1991; Pospisilova and Batkova, 2004) and have positive effects on the photosynthetic activity (Chernyadev, 2009). Auxins promote the plant growth, the root development, cell elongation for tissue differentiation and responses to light and gravity. Auxins are present in root exudates and they are synthesized from the amino acid tryptophan. Indol Acetic Acid (IAA) is the most common auxin among the rhizobacteria (Secundo and Carrea, 2005), present in Bacillaceae, Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae (Ribeiro and Cardoso, 2012), Actinomycetaceae (Legault et al., 2011; Verma et al., 2011) (Lagault et al., 2011; Verma et al., 2011) and Rhizobacteriaceae (Mandal et al., 2009; Sudha et al., 2011). IAA controls the tropisms on plants and promotes the development of the root system (Uggla et al., 1996).

Some rhizobacteria can modulate the production of ethylene in roots. Ethylene is a gaseous plant growth hormone produced endogenously by almost all plants. High concentrations of ethylene in plants induce germination of seeds, increase root development, tissue differentiation, and flowering (Babalola, 2010); but high ethylene

Introduction

concentration after the germination, induces the inhibition of the root system which is harmful for the plant growth (Babalola, 2010b). Apart from being a plant growth regulator, ethylene has also been established as a stress hormone. Under environmental conditions such as salinity (Ahmad et al., 2011), drought (Zahir et al., 2008), waterlogging (Farwell et al., 2008) or high concentration of contaminants (Afzal et al., 2011), production of ethylene can be increased by plants which adversely affects the growth of the plant. The production of endogenous ethylene in roots by plants require of the molecule 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (Accordino et al., 2012), which is an immediate precursor of ethylene biosynthesis. Certain PGPR contain an enzyme, called ACC deaminase, which regulates the production of endogenous ethylene in plants by metabolizing the ACC into ammonium and α -ketobutyrate with the aim to use them as carbon and nitrogen sources (Naganandini et al., 2011; Saleem et al., 2007; Stearns et al., 2012).

Nitrogen is a necessary element for the formation of proteins, nucleic acids and other cellular components, being an essential molecule for the growth of all organisms. In atmosphere nitrogen, in gas form N_2 , represents around 8%. N_2 has a triple bond between the two nitrogen atoms, making it virtually unusable as a molecule for most living things, except for some groups of bacteria, certain algae and some *Actinomycetes*. In order to incorporate it to their metabolism, N_2 must be reduced and fixed in the form of ammonium ion (NH_4^+) or nitrate (NO_3^-). These process is known as Biological Nitrogen Fixation (BNF) and can be developed by free-living organisms or in symbiosis with plants (Mayz-Figueroa, 2004). Nitrogenase complex is the masterpiece of the BNF. This enzyme can be found in fixing organisms, where it catalyzes the conversion of N_2 to NH_4^+ . The activity of the enzyme complex is repressed by presence of oxygen conditions, so fixing organisms have evolved mechanisms (for example high respiratory rate, conformational protection or compartment) to keep oxygen at low levels (Lee et al., 2004; Ureta and Nordlund, 2002).

Phosphorous is an essential element for living organisms. Among other functions, phosphorous plays an important role in energetic metabolism because is necessary to synthesizes the ATP molecule. In addition it can be found in different biological structures, as for example in DNA, RNA and cellular membrane as phospholipids. Thus, low levels of soluble phosphate can limit the growth of plants (Maz and

Introduction

Chowdhury, 1984; Rodriguez and Fraga, 1999). Some PGPRs solubilise phosphate form either organic or inorganic bound phosphates, increasing plant growth (Lipton et al., 1987; Lugtemberg and Kamilova, 2009; Vassilev et al., 2006). PGPRs can solubilise phosphate releasing protons as a response to the absorption of cations of nitrogen sources (Vora and Shelat, 1998). On the other hand, another PGPRs release several enzymes, such as nonspecific phosphatases, phosphonates or phytases which solubilise phosphorous from organic compounds in soil (Lugtemberg and Kamilova, 2009). In addition, other PGPRs produce and release organic acids which increase the acidification of the rhizosphere facilitating the solubilisation of phosphates (Melissa and Schneider, 2006; Omar, 1998).

Iron is essential for almost all living organisms for their involvement in electron transport and metabolic processes. Despite the abundance of iron in Earth's crust, this element is not usually bioavailable in aerobic environments because to the low solubility of iron (III). In classic studies on plant nutrition plants are divide in two groups, depending on the strategy followed to obtain the iron. On one hand, dicotyledonous plants release protons and alter the chemical conditions of the rhizosphere to facilitate the solubilization of the iron (III) (Bienfait et al., 1985). On the other hand, monocot plants produce and release siderophores to the rhizosphere. Siderophores are low molecular weight compounds which posses a high affinity and selectivity for iron (III). Siderophore biosynthesis is usually regulated by iron levels in the microbial environment (Römheld and Marschner, 1986). Bienfait et al. (1985) proposed a third approximation based on the use of microbial siderophores by plants (Bienfait et al., 1985; do Carmo et al., ; Koo and Cho, 2009; Zhang et al., 2012).

6.2 – Crops protection to water stress by PGPRs.

Due to the beneficial effects of PGPRs on plants, these microorganisms can be use as biofertilizers for crops. However PGPRs not only increase the uptake of soil nutrients, in addition PGPRs protect crops against different environmental stresses. Water deficit is the most important abiotic stress in Mediterranean area for plants. This region presents the characteristic of consecutive periods of years with lower rainfall than the medium value (Martínez-Gil, 2006). With these aim Mayak et al. studied the xeroprotector effect on peppers and tomatoes by the strain *Achromobacter piechaudii*

Introduction

ARV8. This bacterium was isolated from dry soil samples and selected for its strong production of ACC deaminase. They observed that after 23 days under water stress, plants inoculated with ARV 8 strain were heavier and presented higher relative water content than non inoculated plants. Under optimum watering conditions, again plants inoculated with the selected strains were heavier and showed higher values of relative water content than non inoculated plants (Mayak et al., 2004b). Similar assays were done by Alguacil et al (2009) on lettuce plants expose to water scarcity and observed that inoculation with *Pseudomonas mendocina* alleviated the effects of water stress (Alguacil et al., 2009). Other studies with *Pseudomonas fluorescens* has shown its potential to protect *Catharantus roseus* to water stress (Jaleel et al., 2007). Kamala-Kannan et al. (2010) studied the growth promoting effect in lettuce and radish plants inoculated with the ACC deaminase producing strain *Pseudomonas entomophila* PS-PJH. Both plants presented a 25% increase in plant growth. Furthermore germination efficiency was 43% higher in inoculated radishes seeds and 34% for lettuces compared to control groups. They also observed greater root length in boot cases. The authors associated these effects to the ACC-deaminase activity of the studied strain (Kamala-Kannan et al., 2010).

Recent efforts to apply these results to greenhouse and field situations include using mixtures of PGPR. Under drought stress, co-inoculation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with *Rhizobium tropici* and two strains of *Paenobacillus. polymyxa* resulted in augmented plant height, shoot dry weight and nodule number, suggesting some synergistic effects from the use of strain mixtures (Figueiredo, 2008).

But PGPRs not only can be applied to plants with economical interest, recent studies have tried to inoculate PGPR to forest plants. Rincon et al (2008) applied the PGPR strain *Pseudomonas fluorescens* Aur6 to seedlings of *Pinus halepensis* and *Quercus coccifera* with the aim to increase their tolerance to drought conditions. The results indicated that inoculated tree seedlings response better to water stress than non inoculated plants (Rincon et al., 2008). Thus, reforestation strategies in Mediterranean area could integrate the inoculation seedlings with PGPR to protect them against abiotic stress factors. In addition, different researches have shown that the addition of PGPRs in soils increase the removal of organic pollutants such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and creosote, due to the increase in the survival rate of seedling in

Introduction

highly polluted soils. Bacteria act by inhibiting of ethylene levels, stimulating plant growth and root system (Deikman, 1997; Huang et al., 2004; Verdoy et al., 2004). Thus, plants with capacity to removal PAHs such as radish (Allard et al., 2005), rice (Ma et al., 2010), birch (Sipilä et al., 2008) or certain grasses (Barrutia et al., 2011) Could be inoculated with PGPR microorganisms with the aim to promote their growth, and hence the remove of pollutants, and protect them to environmental stresses.

OBJETIVOS

Objetivos

El aislamiento e identificación de bacterias resistentes a la falta de agua, así como de los xeroprotectores que les permiten sobrevivir en ambientes sometidos a estrés hídrico, permite una mayor comprensión de los mecanismos fisiológicos que permiten a los microorganismos anhidrobiontes resistir condiciones ambientales tan extremas.

Por otra parte, el potencial estabilizador de los xeroprotectores para evitar los daños ocasionados durante el secado tanto en moléculas como en organismos completos, permite desarrollar aplicaciones de interés biotecnológico. Por tanto la búsqueda de nuevos xeroprotectores no es solo importante para profundizar en los conocimientos teóricos sobre los que se sustenta la vida anhidrobiótica, sino también porque permite obtener nuevos recursos de interés farmacéutico y comercial. Para ello resulta inevitable aislar nuevas bacterias anhidrobiontes, que a su vez pueden tener otras aplicaciones como consecuencia de su tolerancia a la sequía, entre las que destaca la protección de cultivos frente a la ausencia de agua. A tenor de lo expuesto, se plantea como objetivo principal establecer una nueva metodología para aislar e identificar nuevos microorganismos xerotolerantes y nuevos xeroprotectores con aplicaciones biotecnológicas.

Para alcanzar dicha meta, se definieron los siguientes objetivos parciales:

- 1- Aislamiento y caracterización de las cepas microbianas tolerantes a la falta de agua.
- 2- Obtención de compuestos con actividad xeroprotectora a partir de las cepas aisladas y determinación de su capacidad estabilizante.
- 3- Aplicaciones biotecnológicas de las cepas anhidrobiontes para la protección de plantas frente a la sequía.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y métodos

1- Cepas bacterianas.

Las especies bacterianas utilizadas como controles en este trabajo, junto con sus características más relevantes se recogen en la Tabla 3.

Tabla3 – Especies bacterianas utilizadas como controles.

Especie	Características más relevantes
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Sensible a desecación (Narvaez-Reinaldo et al., 2010). Productora de Ácido Indol Acético (Leveau and Lindow, 2005), y 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa positiva (Nelson et al., 2002).
<i>Burkholderia cepacia</i> CC-A174	Cepa no esporulante (Yabuuchi et al., 1993).
<i>Escherichia coli</i> MC4100	Sensible a la desecación (Garcia De Castro et al., 2000).
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> PADD 68	Tolerante a desecación (Manzanera M., comunicación personal).
<i>Bacillus pumilus</i> 15.1	Cepa esporulante (Molina et al., 2010).
<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581 [†]	Cepa halófila (Vreeland, 1980).

2 – Medios de cultivo.

La composición de los medios de cultivo utilizados durante el desarrollo de este trabajo se describe a continuación. Todos ellos se esterilizaron en autoclave por calor húmedo a 120°C durante 30 minutos y 1 atmósfera de presión, o por filtración usando filtros de 0,22 µm de tamaño de poro.

2.1 - Medios enriquecidos

Como medios habituales de crecimiento de las cepas bacterianas se utilizaron *Tryptone soya agar* (TSA) como medio sólido y *Tryptone soya broth* (TSB) como medio líquido, ambos del laboratorio OXOID con números de referencia CM0131 y CM0129 respectivamente. La composición de TSA fue la siguiente: triptona, 15 g; peptona de soja, 5 g; cloruro sódico, 5 g; agar, 15 g y H₂O hasta 1 litro.

Materiales y métodos

La composición del medio líquido TSB fue: digerido pancreático de caseína, 17 g; digerido papaico de harina de soja, 3 g; fosfato potásico di-básico, 2,5 g; cloruro sódico, 5 g; glucosa, 2,5 g y H₂O hasta 1 litro.

Como medio de crecimiento para *E. coli* también se utilizó *Luria Bertani (LB)* como medio líquido y *LB Agar* como medio sólido, ambos comercializados por el laboratorio Novagen de MerckMillipore, con números de referencia 71753 y 71752 respectivamente. La composición del *LB* como medio líquido fue la siguiente: extracto de levadura, 5 g; peptona de caseína, 10 g; cloruro de sodio, 10 g y H₂O hasta 1 litro.

La composición del *LB Agar*: extracto de levadura, 5 g; peptona de caseína, 10 g; cloruro de sodio, 10 g; agar, 12 y H₂O hasta 1 litro.

2.2 - Medios mínimos

2.2.1 Medio Mínimo M9

Para el cultivo de las células en medio mínimo se utilizó una modificación del medio M9, cuya composición fue la siguiente: solución 10xM9, 100 ml; solución A9 (“goodies”), 2,5 ml; MgSO₄ 1M, 1 ml; citrato férrico amónico 6‰ (p/v), 1 ml y H₂O hasta 1 litro (Abril et al., 1991). Las soluciones utilizadas en este medio se prepararon y esterilizaron en el autoclave por separado.

La composición del 10xM9 fue: Na₂HPO₄ x 7H₂O, 70 g; KH₂PO₄, 30 g; NH₄Cl, 10 g; NaCl, 5 g; y H₂O hasta 1 litro.

La solución de A9 (goodies) se compuso de: HBO₃, 300 mg; ZnCl₂, 50 mg; MnCl₂ x 4H₂O, 30 mg; CoCl₂, 200 mg; CuCl₂ x 2H₂O, 10 mg; NiCl₂ x 6H₂O, 20 mg; NaMoO₄ x 2H₂O, 30 mg y H₂O hasta 1 litro.

2.3 - Condiciones de cultivo

Todas las cepas se cultivaron a 30°C, excepto cuando se indique lo contrario en el texto, tanto las cepas que fueron aisladas así como los controles *P. putida*, *B. cepacia*, *A. calcoaceticus* PADD68. Los cultivos líquidos se incubaron en agitación a 40 rpm en un rotatubos (Stuart rotator SB3) con cabezal basculante, o bien a 150 rpm en agitador orbital (Infors HT Multitron).

Materiales y métodos

3 - Conservación de cepas.

La conservación de cepas a corto plazo se hizo en cultivos en estría en placas de medios enriquecidos a 4°C. Para la conservación a largo plazo se realizaron dos copias por cepa de cultivos líquidos en glicerol al 40% (v/v), quedando cada una de las copias en congeladores a -20°C y -80°C.

4 – Manipulación de ADN.

4.1- Minipreparación de ADN total.

Para la preparación de ADN total se utilizó el método modificado descrito por Kado y Liu (1981). Se partió de cultivos saturados en medio TSB tras 24 horas creciendo a 30°C en agitación. Las células de 1,5 ml de dicho cultivo se recogieron por centrifugación a 14.500 rpm durante 2 minutos. Tras retirar el sobrenadante las células se resuspendieron en 425 µl de TE (composición al final del apartado), al que se le añadió 22 µl de SDS al 10% (p/v) y 2 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Las muestras se incubaron durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se añadió 225 µl de solución de lisis, las muestras se mezclaron por inversión suave y se añadieron 4,5 µl de ARNasa (98 unidades/mg) y se incubaron 5 min a temperatura ambiente. Seguidamente las muestras se trataron con un volumen de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 25:24:1 (v/v), para eliminar proteínas, membranas y restos celulares. La fase acuosa se separó de la orgánica por centrifugación a 14.500 rpm durante 15 minutos y se volvió a tratar con un volumen de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico otras dos veces de forma análoga a la descrita anteriormente. Para eliminar restos de fenol de la fase acuosa, ésta se trató con cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 24:1 (v/v). Posteriormente a la fase acuosa se le añadió un décimo del volumen de acetato sódico 3M pH 4,8 y un volumen de isopropanol frío. Las muestras se incubaron a -20°C durante al menos 30 minutos y se centrifugaron a 14.500 rpm durante 15 minutos. El precipitado se lavó de sales con un volumen de etanol frío al 70% (v/v). Tras decantar el sobrenadante y secar el precipitado, éste se resuspendió en 60 µl de agua desionizada estéril.

La composición de las soluciones empleadas en este procedimiento fue la siguiente:

Materiales y métodos

TE: Tris-HCl (pH 8.0) 10 mM y EDTA 1 mM. Esta solución se esterilizó en el autoclave y se almacenó a temperatura ambiente.

Solución de Lisis: 200 µl de SDS al 10%, 150 µl de NaOH (2N) y agua destilada estéril hasta 1ml. Esta solución fue de preparación extemporánea.

Acetato sódico 3M pH 4,8: para preparar esta solución a 60 ml de una solución de acetato sódico 5M se le añadieron 11,5 ml de ácido acético glacial y H₂O hasta 100 ml. Cuando fue necesario, el pH se ajustó a 4,8 con ácido acético glacial. La solución se esterilizó en autoclave.

4.2 - Aislamiento de ADN total a gran escala.

Para la preparación de ADN en gran cantidad y concentración se diseñó un protocolo que permitió la extracción de cantidades de ADN de gran pureza. Para ello se inocularon 500 ml de medio rico (TSB) con 10 ml de un cultivo saturado en y se incubó durante 16 horas a 30°C. Tras la incubación se centrifugó durante 15 minutos a 11.000 rpm, y se resuspendió el precipitado en 30 ml de tampón GTE (50 mM Glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA-Na₂). Se adicionó 60 ml de SDS/NaOH (SDS 1%, NaOH 0,2 N). Tras incubar 15 minutos a 0-4°C, se adicionó 45 ml de KAcF (Acetato de Potasio 3 M, Ácido Fórmico 1,8 M) para neutralizar el pH de la muestra. Después de centrifugar 25 minutos a 11.000 rpm a 4°C, se resuspendió el precipitado en 5 ml de agua y se realizaron 3 ciclos de lavado en Fenol:Cloroformo:Isoamil Alcohol (25:24:1) para retirar las proteínas de la preparación. Para eliminar los restos de fenol se lavó con Cloroformo: Isoamil Alcohol (24:1). Al sobrenadante se le añadió 1 volumen de AcNa (3M, pH 5) y un volumen de isopropanol frío y se incubó 12-16h a -20°C. Tras centrifugar 15 minutos a 11.000 rpm, el precipitado se lavó con 1 volumen de etanol frío al 70% (v/v). Después de centrifugar 15 minutos a 11.000 rpm a 4°C, se eliminaron los restos de alcohol por incubación a 37°C durante 25 minutos. El precipitado se resuspendió finalmente en 30-50 µl de agua desionizada.

4.3 - Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (PCR)

Éste método se utilizó para la amplificación del gen codificante para el ARNr 16S partiendo de ADN total. La reacción de amplificación contenía: ADN molde, 0,2 ng de

Materiales y métodos

ADN total; cebadores, 50-100 pmoles; Taq ADN-polimerasa, 0,5 U/100 µl; H₂O hasta 100 µl. Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: Fase de inicialización a 95°C durante tres minutos, que fue seguida por 25 ciclos compuestos de fase de desnaturalización (30 segundos a 95°C), fase de hibridación con los cebadores (30 segundos a 56°C), y fase de elongación (2 minutos a 72°C). Finalmente se incluyó un paso de 10 minutos a 72°C para terminar de extender posibles cadenas incompletas. La conservación del producto de PCR en la termocicladora se realizó a 10°C por tiempo indefinido. El modelo del termociclador utilizado fue: Bioer xp ciclop. Los oligonucleótidos utilizados quedan reflejados en la tabla 3:

Tabla 3 - Oligonucleótidos utilizados en la PCR

<i>Cebador</i>	5'→3' secuencia	Utilización	Referencia
fd1	CCGAATTCGTCGACAACAGAGT TTGATCCTGGCTCAG	Amplificación y secuenciación	(Weisburg et al., 1991)
rD1	CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAG GTGATCCAGCC	Amplificación y secuenciación	(Weisburg et al., 1991)
fd2	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC	Secuenciación	(Weisburg et al., 1991)
rD2	GACTACCAGGGTATCTAATCC	Secuenciación	(Weisburg et al., 1991)

4.4 - Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

La separación y visualización tanto de fragmentos de PCR, así como de ADN cromosómico se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Por cada 5 µl de muestra a analizar se añadió 1 µl de tampón de carga 6x (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25% y glicerol 30% en agua), y esta mezcla se depositó en un pocillo de

Materiales y métodos

gel de agarosa al 0,7% (p/v) en TAE (Tris-Acetato 40 mM y EDTA 1 mM), sumergido en una cubeta con el mismo tampón. Para fragmentos de ADN inferiores a 0,5 kb, la concentración de agarosa en el gel fue de 1,5% (p/v). La separación se realizó por electroforesis horizontal sumergida a un voltaje entre 70-90 V.

Las moléculas de ADN se tiñeron con bromuro de etidio durante la electroforesis, para ello se añadió 0,5 µl de bromuro de etidio al 1% (p/v) a 30 ml de solución de agarosa en TAE previamente fundida. El ADN se visualizó mediante exposición del gel a luz ultravioleta (a una longitud de onda de 254 nm). El registro fotográfico se realizó con un equipo de documentación de imágenes Volver Lourmat, modelo DOC-print II.

4.5 - Limpieza de las muestras de PCR

Las muestras de PCR de tamaño esperado que no constaban de más bandas fueron limpiadas, para retirar posibles impurezas, como paso previo a la secuenciación. Para ello se utilizó el sistema comercial QIA quick PCR Purification Kit 50 (Cta. No. 28104) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez limpias se volvió a someter a electroforesis una parte para comprobar la presencia correcta del amplicón y se cuantificó tal y como se indica en el subapartado 4.7

4.6 - Secuenciación de ADN

La secuenciación del ADN se realizó por el servicio de secuenciación del Instituto de Biomedicina y Parasitología “López-Neyra” del CSIC en Granada. Para ello se emplearon muestras amplificadas por PCR de entre 500-1.000 pb y limpiadas como se indicó en el apartado anterior, con una concentración comprendida entre 10-40 ng, junto con 6,4 pmol de oligonucleotidos.

4.7 - Cuantificación de ADN en las muestras estudiadas.

La concentración de ADN en las muestras en estudio fue determinada por análisis espectrofotométrico (Nanodrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific). El ensayo se realizó por triplicado.

Materiales y métodos

4.8 - Tratamiento con ADNasas y ARNasas.

Cuando fue necesario eliminar los ácidos nucleicos de la muestra, se prepararon dos muestras en paralelo conteniendo cada una 49 μ l de tampón de reacción 1x (9 partes de agua y una parte de tampón NE para ADNasa I [10x], New England Biolab, BO33035). Cada una se mezcló con un volumen de aproximadamente 1 μ l de ácido nucleico (con una concentración aproximada de 700 ng/ μ l). Una de las muestras se mezcló con 0,5 μ l de ADNasa I (2.000 u/ml) (M03035; New England Biolab) y la otra con 0,5 μ l de agua desionizada. Se agitó y se incubó a 37°C durante 10 minutos. Para detener la reacción ambas muestras fueron adicionadas con 0,5 μ l de EDTA 0,5 M y fueron inactivadas por calor mediante incubación a 75°C durante 10 minutos. Para visualizar la eficacia de la reacción se realizó una electroforesis de ambas muestras. Las bandas visualizadas fueron tratadas con 1 μ l de ARNasa (0,09 U) e incubada durante 1 hora a temperatura ambiente.

5 - Ensayo rápido de esporulación

Para identificar las cepas que producían esporas realizamos un ensayo basado en la diferente sensibilidad de las células vegetativas con respecto a las esporas al tratamiento con calor y en base al método descrito por Vilchez y colaboradores (Vilchez et al., 2008). De esta forma se tomaron colonias independientes procedentes de placas de TSA de al menos 24 horas de crecimiento. Estas colonias se resuspendieron en microtubos estériles de 1,5 ml con 1 ml de solución M9. Seguidamente se sembraron 5 μ l de esta suspensión en TSA. Acto seguido se incubó el resto de la suspensión en termobloque Mixing Block MB-102 a 72°C durante 30 minutos. Nuevamente se tomaron 5 μ l de cada muestra y se sembraron en placa de TSA. Aquellas cepas con capacidad para tolerar el tratamiento con calor se consideraron como esporulantes, mientras que aquellas que no toleraron el tratamiento por calor se consideraron no esporulantes.

6 - Ensayo de xeroprotección de enzimas.

Como modelo de enzima para el ensayo de xeroprotección se utilizó la enzima lipasa de *Burkholderia cepacia* (Sigma-Aldrich 62309). Para la medida de la actividad lipasa se utilizó una variación del método descrito por Ertugrul (2007) consistente en la cuantificación espectrofotométrica del *p-nitrofenol* liberado por la enzima a partir del

Materiales y métodos

sustrato *p-nitrofenol palmitato* (pNPP) (Ertugrul et al., 2007). Para ello se mezclaron 5,5 unidades de lipasa con 15 μ l de la muestra en estudio al 10% (p/v) que se llevaron hasta 1 ml con 985 μ l de Tris-HCl 0,05 M y pH 8; y se mezcló con 1 ml de solución sustrato. Esta mezcla de ensayo se incubó a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 30 minutos en microtubos estériles de 2 ml. La reacción se paró mediante incubación a 100°C durante 4 minutos en termobloque. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro Hitachi U-2000 a una longitud de onda de 410 nm.

La solución sustrato (Glickmann and Dessaux, 1995) se preparó mezclando 10 ml de solución A (30 mg de pNPP en 10 ml de isopropanol) con 90 ml de solución B (0,1 g de goma arábiga y 0,4 ml de Tritón X-100 en 90 ml tampón Tris-HCl 50 mM pH 8). La mezcla de solución A y B se agitó suavemente para su total disolución.

7 - Ensayo de xeroprotección sobre células procariotas

Para estimar la eficacia del xeroprotector sobre células procariotas se utilizó el método descrito por Manzanera et al. (2002). Con este fin se centrifugaron volúmenes de 15 ml de *E. coli* MC4100 con una concentración de 10^7 - 10^9 células/ml. Los precipitados bacterianos se resuspendieron en 100 μ l de una solución con los xeroprotectores en estudio al 10% (p/v), adicionados con 1,5% (p/v) de polivinilpirrolidona (PVP) para aumentar la viscosidad, todas las manipulaciones se realizaron a temperatura ambiente. El desecado se realizó en viales de vidrio de 10 ml, en un desecador al vacío (Dura-stop μ P; FTS Systems) a 30°C de temperatura y 15 mTorr (2 Pa; 2×10^{-5} atm) durante 20 horas seguidas con una rampa de temperatura de $2,5^\circ\text{C}/\text{min}$ con 15 minutos a temperatura constante después de cada incremento en 2°C , hasta un máximo de 40°C . Las muestras fueron selladas bajo vacío y almacenadas durante 1, 15 y 30 días a 30°C . Después fueron resuspendidas en medio de cultivo *LB Broth Miller* hasta un volumen total de 1 ml. Se realizaron diluciones seriadas (en *LB Broth Miller*) sobre placas de *LB Agar Miller* como ensayos de viabilidad. Se incubaron durante 24 horas a 37°C y se estimaron las UFC/ml mediante conteo de colonias antes y después del protocolo de secado para estimar el porcentaje de supervivencia (Manzanera et al., 2002).

8 - Espectroscopía por Resonancia Magnética Nuclear (Kucey RMN)

Para analizar la composición química de las distintas mezclas se realizó un análisis de

Materiales y métodos

resonancia magnética nuclear. Para estos ensayos, en primer lugar se diluyeron 10 mg de las muestras a identificar en 600 μ l de óxido de deuterio (D_2O). Se le realizaron espectros de Resonancia Magnética Nuclear en una dimensión, a partir de 64 lecturas de la secuencia de pulso adquirido. El espectro de trabajo fue de 400 MHz y se registraron en un equipo Bruker (Avance 400 spectrometer). La señal de agua residual se retiró a través del tratamiento WATERGATE 3-9-19 (Walker et al., 1982).

Para incrementar el éxito en la identificación de los metabolitos, se adquirieron también sus secuencias bidimensionales, en función de la correlación espectroscópica 1H - 1H , así como sus espectros heteronucleares 1H - ^{13}C .

9 - Modulación de reacciones de Maillard.

Para estudiar el efecto de distintos aditivos sobre las reacciones de Maillard, el cristal amorfo formado tras incubación a 50°C durante 2 horas por la solución en estudio, se disolvió en 1ml de Tris-HCl, 50 mM a pH 8 y se registró la absorbancia en el espectrofotómetro (Shimadzu UV-1800), según (Kwak and Lim, 2004). Mezclas de azúcares reductores y aminoácidos desecadas dan lugar a reacciones de Maillard (Nursten, 1980), así como control positivo se formuló una solución al 10% (p/v) con partes iguales de glucosa (Carlo Erba 454337) y glutamina (SIGMA G3126-100G).

10 – Experimentación con vegetales.

10.1 – Especímenes vegetales.

Las plantas seleccionadas para distintos ensayos con cepas bacterianas fueron rábanos de la variedad Rojo murciano (*Raphanus sativus*) distribuidas por Semillas Fito.

10.2 – Recubrimiento de semillas con las cepas bacterianas.

El recubrimiento de las semillas de rábanos con las cepas en estudio sobre se realizó por el método descrito por Vílchez y colaboradores (Vilchez et al., 2008). Para ello se inocularon 30 ml de TSB con una colonia y se incubaron una noche a 30°C y 150 rpm. Con este preinóculo se cultivo en 500 ml de TSB y se volvió a incubar 24 horas a 30°C y 150 rpm. Los cultivos se subdividieron en fracciones de 125 ml y se centrifugaron a 13.500 rpm durante 10 minutos. Los cultivos bacterianos centrifugados fueron resuspendidos en 10 ml de una solución al 10% (p/v) de xeroprotector. A continuación

Materiales y métodos

se sometieron a un proceso de liofilización (Labconco Freezone 6) durante 48 horas. Acto seguido se procedió al encapsulado de las semillas para lo cual se adicionaron en 10 ml de cloroformo se adicionaron 500 mg de poliestireno. Una vez disuelto el poliestireno se adicionaron distintas cantidades de los liofilos con aproximadamente $3,27 \cdot 10^{10}$ UFC para todas las cepas en estudio. A la suspensión se le añadió 60 semillas. La mezcla se vertió sobre una placa petri de vidrio y se incubó a temperatura ambiente hasta completar la evaporación del cloroformo. Las semillas recubiertas con bacterias se almacenaron en oscuridad y a temperatura ambiente.

10.3 - Cultivo y cuidados de plantas.

Las macetas utilizadas fueron de tiestos de polipropileno, con dimensiones de 8 x 10 x 7 cm, y se llenaron de una mezcla de vermiculita/sustrato vegetal al 50% hasta el 90% del volumen del tiesto. Estos maceteros se incubaron en una habitación en condiciones de luz, temperatura y humedad controladas. Las condiciones de humedad relativa durante la incubación fueron de 50-60%. La iluminación se basó en ciclos diurnos y nocturnos de 12 horas. La del ciclo diurno fue de $66 \text{ Watt/cm} \cdot \text{s}^2$ (aproximadamente 1.400-1.500 lux). La temperatura se mantuvo constante a 26°C . En todos los experimentos se estableció un ciclo húmedo y un ciclo seco. Las macetas del ciclo húmedo se regaron dos veces por semana hasta el fin del ensayo. Los volúmenes adicionados en cada riego fueron de 40 ml. Las de ciclo seco sólo se regaron hasta que se produjo la germinación de las plantas.

10.4 - Toma de muestras de las plantas.

Al inicio del experimento se midió la altura de las plántulas una semana antes de la primera extracción. En cada punto de muestreo se tomaron 3 plantas incubadas con cada una de las cepas, a las cuales se les midió en el momento de la extracción la altura de la plántula y la longitud de las raíces así como el peso fresco (PF) en una balanza. Tras esto se sometieron a condiciones de turgencia, incubando las plantas durante 48 horas en oscuridad y a una humedad del 100% para medir el peso totalmente túrgido (PTT). Por último se calculó el peso seco (PS) para lo cual se introdujeron las plantas en un horno a $75\text{-}80^\circ\text{C}$ durante 48 horas para poder estimar este valor. Con estos datos se calculó el contenido relativo de agua, CRA, según la siguiente ecuación: $\text{CRA} = (\text{PF}-\text{PS})/(\text{PTT}-\text{PS})$ (Mayak et al., 2004a). También el potencial de recuperación de agua (PRA), según

Materiales y métodos

la ecuación: $PRA = PTT - PF$. Por otro lado se calculó el índice de retención de agua (IRA): $IRA = PF - PS$ (Vilchez et al., comunicación personal).

10.5 - Cultivo de rábanos en huerto.

Semillas de rábanos recubiertos con las cepas en estudio fueron sembrados en huerto al aire libre. Se establecieron riegos por inundación una vez por semana durante 30 días. La recolección se realizó 30 días después del último riego. Se midieron los parámetros descritos en el subapartado 10.4.

11 - Programas informáticos utilizados

Para el tratamiento y análisis de secuencias de nucleótidos se empleó el programa informático Chromas Lite 2.01 (Technelysium Pty Ltd, 1998).

La comparación de nuevas secuencias con las distintas bases de datos, se realizó con la ayuda de los programas BLAST (Altschul et al., 1990) disponible en el servidor de internet de NCBI, y FASTA3 (Pearson and Lipman, 1988) disponible en el servidor de internet del EMBL-EBL.

12 - Tratamiento estadístico de resultados

Para llevar a cabo el análisis estadístico de los resultados obtenidos aplicamos un tratamiento de ANOVA o *t*-Student, según proceda, con el programa estadístico SPSS Statistics 17.0.

Para la aplicación de ANOVA llevamos a cabo el tratamiento según las condiciones de ANOVA para una vía. Según los criterios de ANOVA, cuando esta fue aplicable y, por tanto, se continuó con el tratamiento *post hoc* cuando la probabilidad del factor F fue menor de 0,05 entendiendo que los datos con dicho resultado no eran iguales y mostraban por lo tanto diferencias significativas. En caso de ser el valor de probabilidad de F mayor de 0,05 no se pudo aplicar ANOVA, dado que se entiende que los datos eran iguales y no existía diferencia significativa entre ellos.

En el tratamiento *post hoc* se llevó a cabo en análisis de homogeneidad de varianzas o estadístico de Levene. En este caso se valoró la probabilidad o significancia en torno al valor 0,05. Para los valores de significancia menores de 0,05, se consideró que existían

Materiales y métodos

diferencias significativas en las varianzas de los grupos comparados y se llevó a cabo el tratamiento de la T2 de Tamhane para comprobar entre qué grupos la diferencia era estadísticamente significativa. En el caso de valores superiores a 0,05, se consideró que no existían diferencias significativas en las varianzas de los grupos comparados y se llevó a cabo el tratamiento de Tukey para conocer si entre los grupos estudiados la diferencia era estadísticamente significativa.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1º

1 - Aislamiento de cepas resistentes a la desecación

Con el fin de identificar nuevos xeroprotectores procedimos inicialmente a la puesta a punto de un método para el aislamiento de nuevos microorganismos tolerantes a la desecación. Como se ha indicado en la *Introducción*, resultados anteriores de nuestro grupo han demostrado que células de *Escherichia coli* y de *Pseudomonas putida* KT2440 desecadas de forma estable en presencia de trehalosa o de hidroxietilcelulosa pueden ser tratadas con disolventes orgánicos como el cloroformo, o la acetona sin pérdida de viabilidad y con niveles de supervivencia semejantes a las de esporas naturales de *Bacillus subtilis* (Manzanera et al., 2004c; Vilchez et al., 2008). Esto viene dado por la propiedad de estos xeroprotectores de ser solubles en soluciones acuosas y ser insolubles en estos disolventes orgánicos lo que protege a las células desecadas en presencia de estos xeroprotectores que quedan aisladas y por tanto protegidas frente a daños ocasionados por los mismos solventes orgánicos. Basándonos en estos resultados, propusimos un nuevo método de aislamiento de microorganismos tolerantes a desecación en base a la hipótesis de partida, consistente en que en las muestras de suelos secadas de forma natural puedan existir células protegidas con sus propios xeroprotectores. El desarrollo experimental diseñado constó de tres fases: una fase inicial de tratamiento de muestras de suelo con cloroformo, para obtener una selección positiva de candidatos que mostraran esta tolerancia. Una segunda fase de discriminación de las cepas en función de su capacidad de esporulación, para descartar los aislados esporulantes que toleran el tratamiento con cloroformo por métodos distintos a la producción de xeroprotectores. Y una tercera fase de caracterización de la tolerancia de las cepas no esporulantes a la desecación por aire. Finalmente propusimos la repetición de estas tres fases aplicadas a otros suelos distintos con el fin de corroborar la repetitividad del método.

1.1 - Tratamiento de muestras con cloroformo

Con objeto de aislar cepas bacterianas resistentes al tratamiento con cloroformo, procedentes de muestras de suelo secas, decidimos caracterizar el tiempo de incubación con cloroformo óptimo. Las muestras se tomaron de suelos sometidos a sequía estacional fueron tomadas de Granada (37.182 latitud N y 3.624 longitud 0) en septiembre de 2007, tras 3 meses sin lluvia y de suelos no regados. Las muestras empleadas se tomaron del área de la rizosfera de plantas de adelfa (*Nerium oleander*). Para evitar la presencia de granos gruesos, estas muestras se homogenizaron mediante molido en mortero. Posteriormente se dividieron en viales de vidrio, conteniendo 1 g de suelo homogeneizado por vial. Las muestras de suelo se inocularon en

presencia de cloroformo para eliminar las células sensibles a este disolvente orgánico. Se utilizaron 3 viales a los que se añadieron 3 ml de cloroformo. Paralelamente y por cada uno de estos viales sometidos a tratamientos se utilizó 1 vial no tratado con cloroformo, y que sirvieron como controles para realizar el recuento de bacterias cultivables totales. Tras la adición del cloroformo, los viales tapados se incubaron a temperatura ambiente a distintos tiempos (30, 60 y 120 minutos) con agitación ocasional para garantizar una mezcla homogénea. Para eliminar el cloroformo de las muestras una vez transcurrido el tiempo de contacto, las muestras de suelo se depositaron en placa petri de vidrio estéril sin tapadera hasta completar la evaporación del cloroformo. A continuación, las muestras se mezclaron con 10 ml de TSB y se realizaron diluciones seriadas sobre placas de TSA con el fin de cuantificar el número de células supervivientes al tratamiento con cloroformo y de obtener aislados independientes. La figura 4 muestra los resultados de este ensayo en los que se observa una reducción general del número de unidades formadoras de colonia por gramo de suelo con el aumento en el tiempo de tratamiento. Así, inicialmente se estimó una presencia de $2 \cdot 10^5$ UFC/g de suelo en las muestras sin tratar, mientras que estas se redujeron a $1,3 \cdot 10^5$ UFC/g de suelo tras 30 minutos de tratamiento. Esta reducción continuó en el tiempo, pasando a $1 \cdot 10^5$ UFC/g de suelo transcurridos 60 minutos de tratamiento y a $3 \cdot 10^4$ UFC/g de suelo tras 120 minutos de tratamiento.

1.2 - Ensayo de esporulación

Dada la capacidad de las esporas de sobrevivir a tratamientos con cloroformo (Bloomfield and Arthur, 1994; McDonnell and Russell, 1999; Russell, 1990; Vilchez et al., 2008), realizamos un ensayo rápido de esporulación para poder discriminar entre esporas y células vegetativas xeroprotegidas con capacidad para resistir tratamiento con cloroformo. Antes de realizar este ensayo se realizó previamente un paso de purificación de las cepas mediante siembra por agotamiento en placas de TSA. Se seleccionaron aleatoriamente más de 36 cepas de cada dilución por cada tiempo de ensayo con el cloroformo, lo que supuso un total de 223 colonias ensayadas. El ensayo se realizó tal y como se describe en la sección 5 de *Materiales y métodos* incluyendo como controles positivos y negativos colonias de *Bacillus pumilus* y de *Burkholderia cepacia* respectivamente. Como era de esperar en el caso de *B. cepacia* se observó crecimiento solo antes del tratamiento a 72°C, mientras que para *B. pumillus* se observó crecimiento tanto antes como después del tratamiento con calor. Partiendo de estos resultados se seleccionaron las cepas incapaces de tolerar el tratamiento con calor. La figura 6 muestra que la proporción de cepas esporulantes aumentó con el tiempo de tratamiento con

cloroformo de la muestra hasta un tiempo de 60 min a partir de los cuales se mantuvo estable. La proporción de cepas esporulantes pasó de niveles inferiores al 50% para muestras no tratadas y a niveles superiores al 80% tras 60 min de exposición de las muestras de suelo al cloroformo.

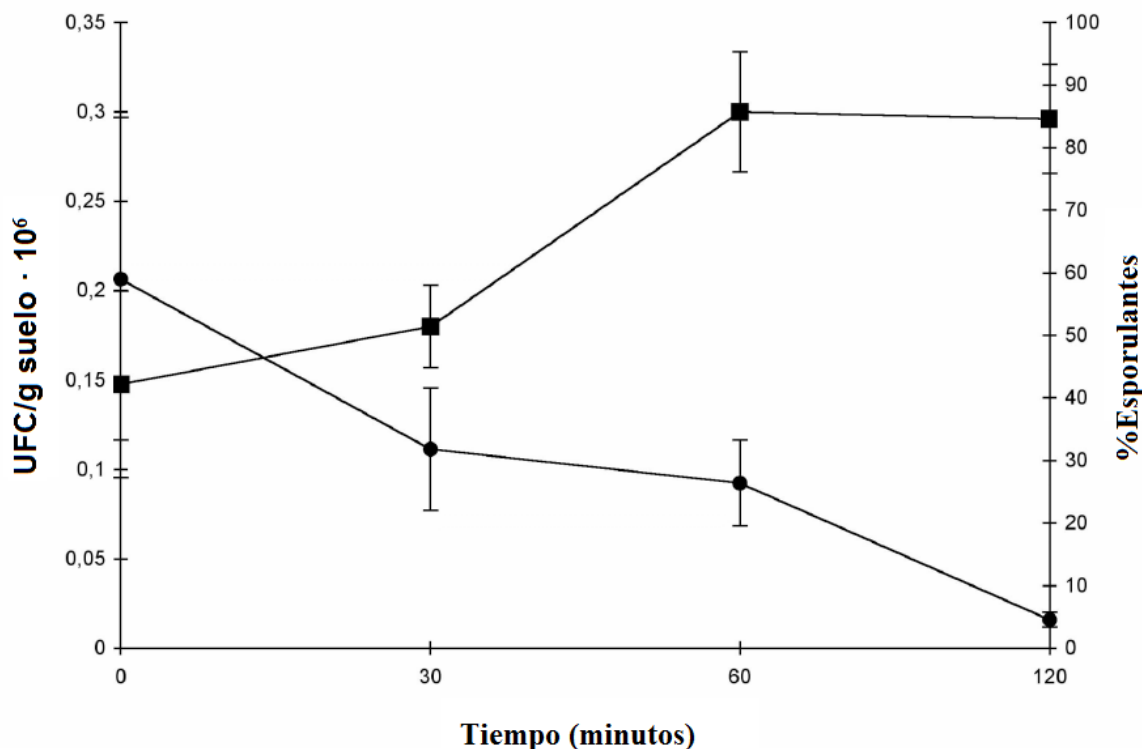


Figura 6 - Número de UFC y proporción de cepas esporulantes con respecto al tiempo para muestras tratadas con cloroformo. En el eje de la izquierda se representa el número de UFC/g de suelo (cuadrados y en el eje de la derecha se representa la proporción de células esporulantes de las UFC obtenidas en cada tiempo (círculos). El tiempo de contacto con cloroformo se representa en el eje de las X.

1.3.- Ensayo de secado al aire

Con el fin de analizar la capacidad de tolerar la desecación de las cepas aisladas no esporulantes se realizó un estudio de desecación al aire. En este ensayo se incluyó una cepa de *Acinetobacter calcoaceticus* (PADD68) aislada del desierto de Tabernas (Almería) identificada como tolerante a la desecación en un estudio previo (Manzanera M., comunicación personal) y que se utilizó como control positivo. Además también se incluyó en el estudio células de *Pseudomonas putida* KT2440 que se utilizaron como controles negativos al ser una cepa sensible a la desecación (Manzanera et al., 2002).

Para este ensayo se utilizaron colonias independientes de las 77 cepas identificadas como no esporulantes aisladas en el estudio anterior y procedentes de placas de TSA de 48 horas. Para

Resultados – Capítulo 1°

calcular su nivel de tolerancia a la desecación, se suspendió una colonia de cada cepa en 1 ml de solución estéril de M9 para mantener un nivel de tonicidad adecuado. A continuación se realizaron diluciones seriadas sobre placas de TSA con el objetivo de identificar el número de UFC/ml al comienzo del ensayo. Por otro lado, se tomaron 100 µl de cada suspensión y fueron depositados como gotas independientes de 5-10 µl sobre microplacas petri estériles para facilitar la evaporación rápida del agua. Estas se dispusieron en una campana de flujo de aire laminar bajo corriente de aire estéril hasta su secado en aproximadamente 1-2 horas. Tras este periodo permanecieron en las mismas condiciones hasta un tiempo total de 24 horas para asegurar el proceso de estrés hídrico. Transcurrido el periodo de secado se resuspendieron las células en 1 ml de solución estéril M9 durante 10 min y se realizaron diluciones seriales sobre placas de TSA. Se cuantificó el número de UFC tras incubación a 30°C durante 24-48 horas. Para calcular la tasa de supervivencia se comparó el número de UFC tras el secado con respecto al inicial en porcentaje.

En una primera fase los ensayos se realizaron de forma simple en lugar de por triplicado para facilitar técnicamente el ensayo, dado el gran número de cepas involucradas. Todas las suspensiones bacterianas mostraron un número de entre 10^7 Y 10^9 UFC/ml previo a su incubación en condiciones de aire estéril. Como resultado de esta primera ronda se seleccionaron 14 cepas por sus altos niveles de supervivencia superiores al 4%, valor presentado por *A. calcoaceticus* PADD68 en estudios anteriores. Con estas cepas que produjeron niveles de resistencia superiores al 4% se volvió a ensayar su tolerancia a la desecación, pero en esta ocasión el ensayo se realizó por triplicado con el fin de conocer la desviación estándar respecto a la media de cada ensayo. Los resultados mostraron un nivel de supervivencia por debajo del nivel de detección para *P. putida* KT2440, y del 4% para el control positivo *A. calcoaceticus* PADD68 como se puede observar en la figura 3. También en la figura 7 se representa el valor de supervivencia de las cepas, las cuales se nombraron con un código que comenzó por un número seguido de la letra J que identifica el vial del que procede. De esta forma podemos asociar el nombre de la cepa con el tipo de tratamiento dado a la muestra de suelo del que procede. Los números 1J, 2J y 3J se correspondieron con cepas procedentes de muestras no tratadas. Mientras que los números 4J se corresponden con cepas que proceden de muestras de suelo tratadas con cloroformo durante 30 min, las 5J proceden de suelos tratados durante 60 min, y las 6J proceden de suelos tratados durante 120 min. Si se exceptúan los casos 2J8.A y 3J1, se puede observar que a medida que aumentan los tiempos de tratamiento con cloroformo aumenta el nivel de supervivencia ante desecación por aire.

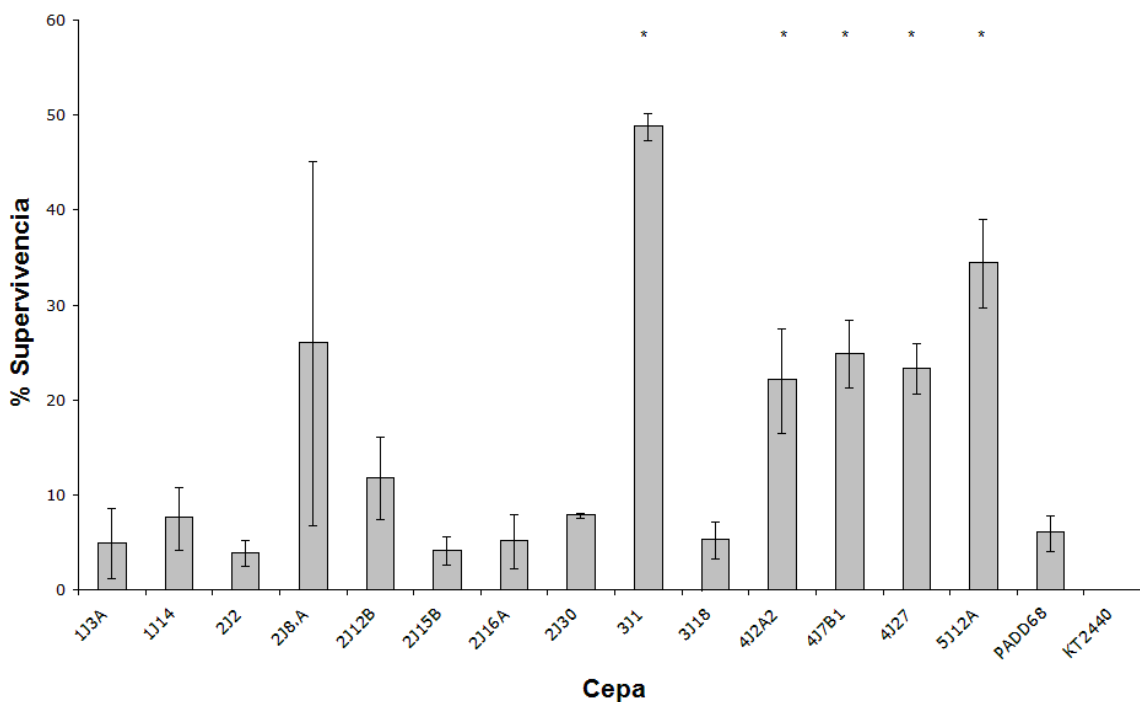


Figura 7 – Tolerancia a la desecación de los aislados. En el eje de abscisas se indica el nombre de la cepa donde el número anterior a la letra, identifican el vial de procedencia de la muestra (y por tanto el tratamiento seguido). En el eje de ordenadas se indica los niveles de supervivencia como media de tres ensayos. También se indica la desviación estándar con respecto a la media representado en forma de barras de error. Los asteriscos muestran diferencias significativas respecto al control positivo basado en el cálculo de la distribución *t*-Student.

Para identificar si las cepas presentaban una tolerancia a la desecación significativamente superior al control positivo se realizó un tratamiento estadístico, basado en el cálculo de la distribución *t*-Student. Estas cepas fueron clasificadas como hipertolerantes a la desecación.

Según el tratamiento estadístico las cepas con una tolerancia significativamente superior al control positivo se denominaron hipertolerantes a la desecación, y fueron las siguientes: 3J1, 4J2A2, 4J7B1, 4J27 y 5J12A. Estas cepas, a excepción de la 3J1, fueron aisladas a partir de muestras de suelos puestas en contacto con cloroformo.

Las cepas presentes en la figura 7, a excepción de las utilizadas como controles, se propusieron como potenciales candidatos para la producción de moléculas con capacidad xeroprotectora. No obstante, el presente trabajo se ha centrado en el estudio de los xeroprotectores procedentes de las cepas hipertolerantes a la desecación.

2 – Identificación taxonómica de las cepas resistentes a la desecación

Con objeto de identificar si los aislados pertenecen a grupos taxonómicos descritos como tolerantes a la desecación se procedió a la amplificación y secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S de cada aislado. La estrategia de PCR empleada para aislar las cepas seleccionadas se basó en el uso de los oligonucleótidos fd1 y rd2, tal y como se describe en la sección 4 de *Materiales y métodos*. Para ello se inocularon 3 ml de TSB con una colonia de cada aislado. Transcurridas 24 h de incubación a 30°C en agitación, se centrifugaron 1,5 ml y el precipitado celular se utilizó para realizar una extracción de ADN total como se indica en la sección 4.1 de *Materiales y métodos*. A continuación se realizó la reacción de amplificación del gen codificante para el ARNr 16S partiendo del ADN total extraído, como se indica en el apartado 4.3 de *Materiales y métodos*. Se determinó la concentración de los ADNs aislados y se preparó la reacción de amplificación que contenía: ADN molde, 0,2 ng de ADN total; cebadores, 50-100 pmoles; Taq ADN-polimerasa, 0,5 U; H₂O hasta 100 µl. Tras la amplificación gel gen, se comprobó la calidad del amplicón mediante electroforesis en gel de agarosa con el fin de proceder a la purificación solo de los amplicones con un único producto de PCR. Con el fin de eliminar oligonucleótidos, Taq polimerasa, dNTPs y otros productos en la reacción se procedió a la limpieza de los amplicones que se realizó siguiendo el apartado 4.5 de *Materiales y métodos*. En la figura 8 se observa el producto de PCR con un tamaño estimado de 1,5 Kb.

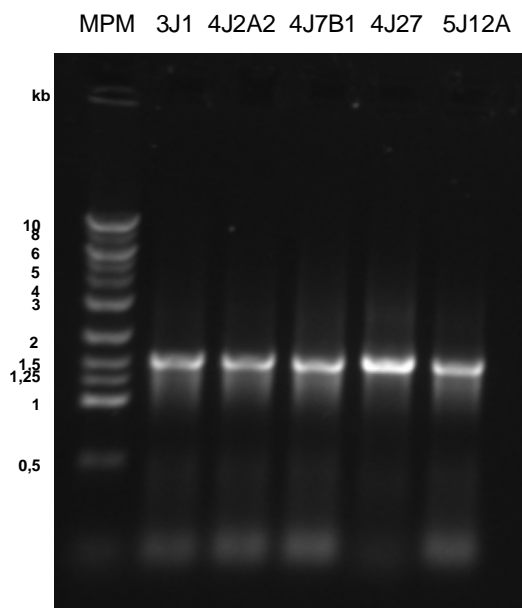


Figura 8 - Productos de PCRs de las cepas hipertolerantes a desecación. Se muestran los amplicones como resultado de someter a electroforesis 3 µl de cada PCR. El marcador de peso molecular (MPM) fue de 10 kb de MBL; se indica el nombre de la cepa de la que proviene cada PCR: 3J1, 4J2A2, 4J7B1, 4J27 y 5J12A.

Para conocer la secuencia nucleotídica de los productos de amplificación se prepararon mezclas de 12 µl de volumen con una concentración entre 80-200 ng de muestra limpia y 6,4 pmoles de los oligonucleótidos fD2 y rD2 indicados en la tabla 4. El resultado de la amplificación se analizó con el programa Chromas Lite 2.01 y se ensambló utilizando la ayuda de los programas BLAST (Altschul et al., 1990) disponible en el servidor de internet de NCBI, y FASTA3 (Pearson and Lipman, 1988) disponible en el servidor de internet del EMBL-EBL. Las secuencias ensambladas se depositaron en la base de datos NCBI. En la tabla 5 se muestra el número de pares de bases obtenidas así como los valores de identidad en tanto por ciento. Tras alinear las secuencias obtenidas con las depositadas en el banco de datos NCBI, las cepas 3J1, 4J2A2, 4J7B1, 4J27 y 5J12A mostraron su afiliación, todas con una similitud del 99%, con los grupos taxonómicos *Microbacterium* sp, *Rhodococcus* sp, *Leucobacter* sp, *Arthrobacter* sp, *Arthrobacter* sp respectivamente. Igualmente se indica el número de acceso tras el depósito de las secuencias: GU815136, GU815137, GU815138, GU815139 y GU815140 respectivamente. Cabe destacar que todas las cepas pertenecen a la familia *Actinobacteriae* y al orden *Actinomycetales*.

Tabla 5 - Análisis de las secuencias codificantes para el ARNr 16S de las cepas hipertolerantes a la desecación. En la primera columna se indica el nombre de la cepa analizada, en la segunda columna se indica el grupo taxonómico más cercano a nivel de género. En la tercera columna se muestra el número de pares de bases comparados. En la cuarta columna aparecen los números de acceso de las secuencias más parecidas en el banco de datos de NCBI.

Cepa	Grupo taxonómico	N° de pares de bases comparados	Número de acceso de las secuencias más parecias
3J1	<i>Microbacterium</i> sp	1.416	<u>EU714371.1</u>
4J2A2	<i>Rhodococcus</i> sp	1.352	<u>U27579.1</u>
4J7B1	<i>Leucobacter</i> sp	1.336	<u>DQ406732.1</u>
4J27	<i>Arthrobacter</i> sp	1.420	<u>GU391465.1</u>
5J12A	<i>Arthrobacter</i> sp	1.408	DQ486130

3 – Validación de la metodología de aislamiento de bacterias hipertolerantes a sequía.

Con el objetivo de validar la metodología de aislamiento propuesta para la obtención de cepas hipertolerantes a desecación a partir de muestras de suelos secos, se realizó un nuevo aislamiento. Para verificar la eficacia del método, el nuevo aislamiento se realizó a partir de muestras de suelo de procedencia distinta a las utilizadas en el primer aislamiento. También se pretendía determinar la validez del método para seleccionar bacterias xerotolerantes que además presenten otras cualidades. En este aislamiento concreto se pretendió aislar bacterias tolerantes a sequía y resistentes a la presencia de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs). Las muestras se tomaron de un mesocosmos expuesto al aire libre, en ausencia de riegos y contaminado con diesel en enero de 2010. El procedimiento utilizado fue similar al del primer aislamiento pero con las siguientes modificaciones: se homogeneizaron 4 muestras de suelo de las que se tomaron fracciones de 1 g y se mezclaron con 3 ml de cloroformo. Se incubaron con cloroformo a temperatura ambiente durante 60 minutos y se retiraron los restos de cloroformo por evaporación como en el aislamiento anterior. Las muestras de suelo tratadas se resuspendieron en 50 ml de medio mínimo adicionados al 1% (p/v) con alguno de los HPAs siguientes: naftaleno, pireno, fenantreno y antraceno como única fuente de carbono. Los matraces se incubaron durante 7 días a 30°C y 150 rpm. Tras el periodo de incubación, de cada matraz se seleccionaron y purificaron 8 colonias con morfologías distintas detectadas en las diluciones seriadas sobre TSA realizadas. A continuación se aplicó el ensayo de esporulación para el que 7 cepas mostraron resultados negativos. Para el ensayo de xerotolerancia se utilizó como control negativo la cepa xerosensible de *P. putida* KT2440 y

como control positivo la cepa hipertolerante 3J1 del primer aislamiento. La figura 9 muestra los resultados obtenidos. Los nombres de las cepas se formaron a partir de dos letras y un número. La letra J indica el vial de procedencia. La letra siguiente el matraz de procedencia, siendo A para el matraz con antraceno, P con pireno, F con fenantreno y N con naftaleno. El número se asignó para diferenciar las cepas procedentes del mismo matraz.

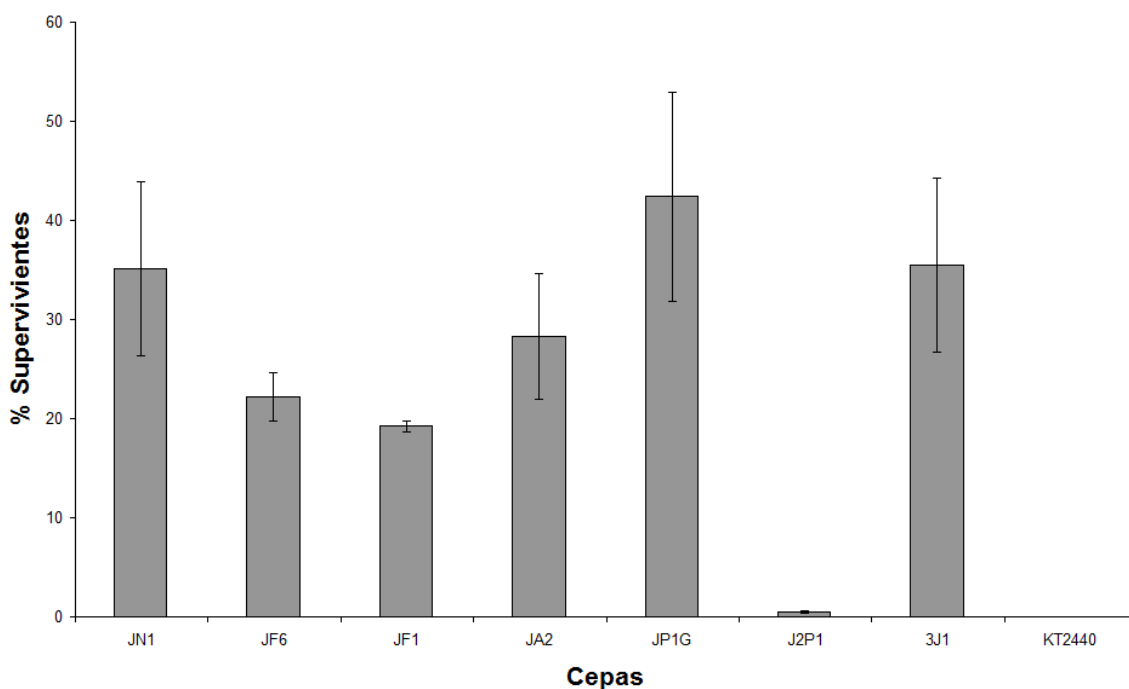


Figura 9 – Tolerancia a la desecación de aislados de mesocosmos. En el eje de abscisas se indica el nombre de la cepa donde la segunda letra indica el matraz de procedencia de la cepa y por tanto el HPA al que es resistente. En el eje de ordenadas se indica los niveles de supervivencia como media de tres ensayos. También se indica la desviación estándar con respecto a la media representado en forma de barras de error.

Los nuevos aislados, a excepción de la cepa J2P1, mostraron niveles de supervivencias muy superiores al control negativo. Aunque ninguno de los aislados superó el nivel de xerotolerancia del control positivo, se seleccionaron como hipertolerantes a desecación las cepas JN1, JF6, JF1, JA2 y JP1G. Así quedó validada la metodología propuesta para el aislamiento de cepas bacterianas hipertolerantes a sequía. Además se verificó su posible modificación para aislar anhidrobiontes que presenten otras características adicionales, como en este caso la resistencia a la presencia de HPAs.

También se realizó la identificación taxonómica de las cepas seleccionadas en el aislamiento de validación. Para ello se siguió el mismo procedimiento descrito para la caracterización taxonómica de las cepas del primer aislamiento. Tras alinear de nuevo las secuencias

Resultados – Capítulo 1°

obtenidas para las cepas del aislamiento de validación con las depositadas en el banco de datos NCBI, las cepas JN1, JP1G, JA2 y JF1 mostraron su afiliación con el grupo taxonómico *Arthrobacter* sp, con una similitud del 99% y números de acceso para la base de datos de NCBI: GU815140, mostrado en la tabla 5. La cepa JF6 se afilió al 99% con el grupo taxonómico *Microbacterium* sp con número de acceso EU714379 también mostrada en la tabla 7. De nuevo todos los aislados pertenecieron también a la familia *Actinobacteriae* y al orden *Actinomycetales*.

Tabla 5 - Análisis de las secuencias codificantes para el ARNr 16S de las cepas hipertolerantes a la desecación. En la primera columna se indica el nombre de la cepa analizada, en la segunda columna se indica el grupo taxonómico más cercano a nivel de género. En la tercera columna se muestra el número de pares de bases comparados. En la cuarta columna aparecen los números de acceso de las secuencias más parecidas en el banco de datos de NCBI.

Cepa	Grupo taxonómico	N° de pares de bases comparados	Número de acceso de las secuencias más parecidas
JF6	<i>Microbacterium</i> sp	1478	EU714379
JF1	<i>Arthrobacter</i> sp	1485	GU815140
JP1G	<i>Arthrobacter</i> sp	1487	GU815140
JN1	<i>Arthrobacter</i> sp	1488	GU815140
JA2	<i>Arthrobacter</i> sp	1486	GU815140

CAPÍTULO 2º

1 – Caracterización de moléculas con propiedades xeroprotectoras

Dado que los aislados xerotolerantes se obtuvieron mediante selección en presencia de cloroformo, partimos de la hipótesis de que estos microorganismos producen xeroprotectores con capacidad semejante a la de la trehalosa o la hidroxiectoína para proteger a la célula contra el disolvente orgánico. Para identificar las moléculas acumuladas con capacidad para proteger biomoléculas sensibles a la desecación se recurrió a una estrategia basada en tres pasos. En un primer paso se realizó una extracción de las moléculas acumuladas mediante una variación de la técnica conocida como “ordeñado bacteriano” por estrés osmótico y estrés por desecación. En un segundo paso se realizó un ensayo de xeroprotección con las sustancias obtenidas para identificar la capacidad de las mismas para proteger enzimas y células procariontas frente a la desecación. Y en un tercer lugar se realizó una identificación de las moléculas por Resonancia Magnética Nuclear.

1.1 - Ensayo de halotolerancia

Tal y como se ha indicado en la *Introducción*, la alta presencia de sales puede interpretarse en algunos casos como una fase inicial en el proceso de secado de una célula. En estas condiciones la presencia de alta concentración de sales en el medio provoca un acúmulo de solutos compatibles en las células (Sauer and Galinski, 1998). Si tras este acúmulo las células se incuban en baja concentración de sales entonces generalmente se produce una liberación de estas sustancias. Sin embargo, si la concentración de sales en el medio está por encima del máximo tolerado por la célula esta muere sin conseguirse la producción y acumulación de solutos compatibles deseados. Con el fin de identificar la concentración de NaCl tanto óptima como máxima tolerada para el crecimiento de las distintas cepas seleccionadas se procedió a realizar un estudio del crecimiento de estas cepas en distintas concentraciones de cloruro sódico. Se partió de inóculos saturados en TSB de los cuales se adicionó el volumen necesario (entre 800 y 1.000 μ l), hasta alcanzar una absorbancia de 0,05 en tubos de ensayo con 5 ml de medio mínimo adicionados con 50 mM de glucosa como única fuente de carbono. Además se añadió cloruro sódico en concentraciones de 8,5 mM; 0,2 M; 0,4 M; 0,8 M y 1,6 M. Como control positivo se incluyó *Halomononas elongata*, dado que es una cepa caracterizada como halotolerante (Vreeland, 1980) y a *Pseudomonas putida* KT2440 como cepa halosensible (García De Castro et al., 2000; Manzanera et al., 2002; Narvaez-Reinaldo et al., 2010). Los cultivos se incubaron en agitación durante 24 h tras las cuales se registró la absorbancia a

Resultados – Capítulo 2º

600nm de longitud de onda. En la figura 10 se reflejan los resultados obtenidos en forma de absorbancias alcanzadas en cada una de las condiciones descritas.

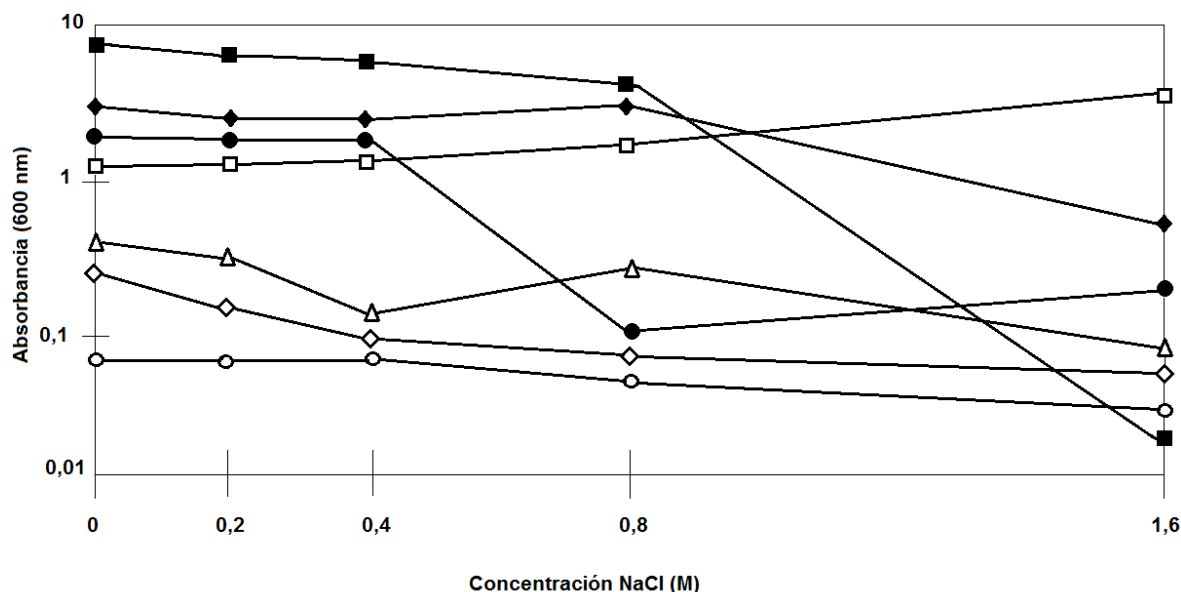


Figura 10 – Absorbancia de los aislados a distintas concentraciones de NaCl. En el eje de abscisas se representa la concentración de NaCl, y en el de ordenadas se representa la absorbancia de los cultivos a una longitud de onda de 600 nm tras 24 horas de incubación a 30°C. En la gráfica las cepas quedan representadas por los siguientes símbolos: □, *H. elongata* (control positivo); ■, *P. putida* KT2440 (control negativo); △, *Microbacterium* sp 3J1; ◇, *Rhodococcus* sp 4J2A2; ○, *Leucobacter* sp 4J7B1; ◆, *Arthrobacter* sp 4J27; ●, *Arthrobacter* sp 5J12A.

Con respecto a la absorbancia alcanzada, se observó una reducción de la misma para todas las cepas aisladas a medida que aumentó la concentración de NaCl. Al igual que ocurrió con el control negativo *P. putida* KT2440. Sin embargo, en el caso del control positivo *H. elongata* se produjo un aumento de la absorbancia con el aumento de la concentración de sales.

A lo largo de este ensayo, se observó el desarrollo de flóculos en el medio líquido como producto de la agrupación de los microorganismos presentes en todas las cepas en estudio, a distintas concentraciones de NaCl para cada cepa. Estos resultados, junto con la concentración a la cual se produjo la máxima densidad, óptima se expone en la tabla 6.

Resultados – Capítulo 2°

Tabla 6 – Concentración de NaCl óptima y máxima tolerada por las cepas hipertolerantes a desecación. En la tabla aparece reflejada la concentración óptima de NaCl a la cual se produce la máxima absorbancia. También la concentración de NaCl máxima tolerada (M), a la cual el crecimiento bacteriano deja de ser uniforme para hacerlo en formas esféricas.

Cepa	[NaCl] óptima	[NaCl] máxima
<i>Arthrobacter</i> sp 4J27	0,8 M	1,6 M
<i>Arthrobacter</i> sp 5J12A	0,2 M	0,8 M
<i>Rhodococcus</i> sp 4J2A2	0,2 M	0,4 M
<i>Microbacterium</i> sp 3J1	0,2 M	1,6 M
<i>Leucobacter</i> sp 4J7B1	0,2 M	0,2 M
<i>H. elongata</i>	1,6 M	No detectada
<i>P. putida</i>	0,2 M	1,6 M

1.2 - Ordeñado bacteriano

1.2.1- Productos obtenidos mediante estrés osmótico

Gracias a la determinación de las concentraciones óptimas y máximas toleradas por los distintos microorganismos seleccionados se decidió realizar la extracción de las moléculas acumuladas mediante una variación del método descrito por Sauer y Galinski (1998). Con este fin se utilizaron las cepas seleccionadas como hipertolerantes a desecación *Microbacterium* sp 3J1, *Rhodococcus* sp 4J2A2, *Arthrobacter* sp 4J27, y *Arthrobacter* sp 5J12A. Se descartó trabajar con la cepa *Leucobacter* sp 4J7B1 por presentar escaso crecimiento en medio mínimo con glucosa como muestra la figura 7. Además se incluyó a *H. elongata* como control positivo dado que ya había sido empleada por Sauer y Galinski para la obtención de hidroxiectoína. Como control negativo se incluyó a *P. putida* KT2440 como ejemplo de cepa halosensible y xerosensible. En primer lugar se inocularon matraces con 100 ml de medio mínimo adicionado con la concentración óptima de NaCl, con 1 ml de cultivos saturados de cada cepa en estudio. Los matraces se incubaron en agitación durante 48 horas. Posteriormente, se aumentó la concentración de NaCl hasta la máxima concentración tolerada determinada en el ensayo anterior utilizando una solución de NaCl 5 M estéril. Una vez adicionado el NaCl se volvieron a incubar durante 48 horas a 30°C y 150 rpm. Transcurrido este periodo de incubación, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 2.500 rpm en una centrifuga Beckman Avanti-J25. Se retiraron los sobrenadantes y los precipitados bacterianos se resuspendieron en 20 ml de agua destilada estéril. Las suspensiones celulares se

incubaron durante 20 minutos a 30°C y 150 rpm para permitir la liberación de los compuestos acumulados. A continuación se repitió el proceso de centrifugado pero en este caso los sobrenadantes, donde teóricamente se encontraban las moléculas liberadas por las células, fueron filtrados utilizando un filtro desechable de 0,22 μm , mientras que los precipitados bacterianos se descartaron. Los productos filtrados fueron divididos en dos fracciones, uno destinado a determinar su actividad xeroprotectora y otro para identificar su composición química por análisis de RMN, como se ha descrito en la sección 8 de *Materiales y métodos*. Finalmente las dos fracciones fueron liofilizadas utilizando un equipo Labconco Freezone 6 durante 48 horas. El producto final se denominó Producto de Ordeñado Bacteriano (POB). Éste producto se solubilizó en agua desionizada hasta una concentración del 10% (p/v). El nombre de cada POB consistió en el nombre de la cepa de procedencia, seguido por la letra S que hace referencia al método Standard, y precedido por la letra N que hace referencia a su origen natural. Estos POBs se utilizaron en estudios de estabilización por secado de enzimas y células, así como para su análisis químico por RMN.

1.2.2- Productos obtenidos mediante estrés por desecación

Dado que el método de extracción descrito en el apartado anterior está diseñado para la obtención de solutos compatibles involucrados en halotolerancia, realizamos una variante del método para adaptarlo a la tolerancia a la desecación. Así, una vez caracterizada la tolerancia a la desecación de los distintos aislados se decidió realizar la extracción de las moléculas acumuladas mediante un ciclo de secado (Narvaez-Reinaldo et al., 2010). Para ello se tomó una colonia de cada una de las cepas seleccionadas como hipertolerantes a desecación 3J1, 4J2A2, 4J7B1, 4J27, y 5J12A que se utilizó para inocular matraces con 100 ml de medio mínimo a la concentración de NaCl óptima previamente determinada para esa cepa. Los cultivos fueron incubados durante 48 horas a 30°C en agitación, tras lo cual se centrifugaron durante 15 minutos a 11.000 rpm. Los precipitados bacterianos se resuspendieron en 5 ml de una solución de 1xM9 y se depositaron sobre filtro de membrana de 47 mm de diámetro y 0,22 μm de tamaño de poro (EZGSWG474; Millipore). Estos fueron dispuestos sobre placas de medio mínimo sin tapadera y se incubaron bajo un flujo de aire estéril de 1.575 m^3/h durante 8 horas. Transcurrido este tiempo, las células presentaron una apariencia seca tras lo cual los filtros inoculados fueron retirados de las placas e incubados otras 16 horas bajo el mismo flujo de aire estéril. Finalmente los filtros se retiraron y se resuspendieron en 30 ml de agua destilada estéril donde se incubaron bajo agitación durante 20 minutos. Las células se separaron por centrifugación a 11.000 rpm, a 10°C durante 15 minutos y se descartaron

reservando estos sobrenadantes en esta ocasión. Por otra parte los sobrenadantes se filtraron utilizando un filtro desechable de 0,22 μm de tamaño de poro. De nuevo los productos filtrados fueron divididos en dos fracciones: uno para comprobar su actividad xeroprotectora y el otro para identificar su composición química por análisis de RMN. Ambas fracciones fueron liofilizadas durante 48 horas. Una vez liofilizadas, estos Productos de Ordeñado Bacteriano Secados por Incubación al Aire (POBSIA) fueron solubilizados en agua desionizada hasta una concentración del 10% (p/v). El nombre de cada POBSIA consistió en el nombre de la cepa de procedencia, seguido por la letra D que hace referencia al método de obtención por desecado, y precedido por la letra N que hace referencia a su origen natural.

1.3 - Ensayo de xeroprotección

1.3- Estabilización de enzimas con xeroprotectores por secado

Para conocer la capacidad estabilizante frente a la desecación generada por cada solución tanto de POB como de POBSIA se realizaron ensayos de protección de enzimas. Como enzima a estabilizar se propuso el empleo de lipasa, dada la facilidad de seguir su actividad por métodos colorimétricos. Los ensayos de actividad lipasa se realizaron tal y como se describe en el apartado 6 de *Materiales y métodos*. Previamente a los ensayos de protección se realizaron estudios de actividad de la enzima lipasa en los POBs y POBSIAs para identificar si los microorganismos en estudio eran capaces de producir lipasa extracelular que pudieran alterar el resultado. Con este fin se tomaron 15 μl de POBs y POBSIAs al 10% (p/v) y se realizó el mismo procedimiento descrito en el apartado 6 de *Materiales y métodos* para el ensayo de xeroprotección de enzima, sin mezclar los xeroprotectores con lipasa. Los resultados de estos estudios mostraron una absorbancia de entre 0 y 0,007 de los POBs y POBSIAs, mientras que esta fue de 0,3 para el control positivo de una solución de trehalosa al 10% (p/v) con 5,5 U de lipasa, y de 0 para el control negativo de agua desionizada sin lipasa. A la baja absorción que presentaron los POBs y POBSIAs se procedió a la estabilización de 5,5 unidades de lipasa en 15 μl de diferentes soluciones incluyendo: solución de trehalosa al 10% (p/v) como control positivo, agua desionizada como control negativo o bien el POB o el POBSIA al 10% (p/v) que correspondiese. Con objeto de determinar las condiciones de secado para las que la actividad de la enzima lipasa se ve afectada por la falta de agua, se ensayó el tiempo óptimo de formación del cristal amorfo utilizando distintos protocolos de secado. Estos protocolos incluyeron incubación de las soluciones a 50°C durante 90 y 120 minutos. Así como protocolos de un secado secundario a 100°C durante 5, 10 y 20 minutos,

Resultados – Capítulo 2°

para retirar posibles restos de agua presentes. Como resultados de estos análisis se observó que tras 90 minutos de incubación a 50°C, los xeroprotectores no mostraban un aspecto de cristal amorfo, mientras que a 120 minutos sí se observó ese efecto. Respecto al protocolo de secado secundario se eligió 5 minutos como tiempo de incubación, debido a que a períodos de exposición superiores alteraban la estructura del cristal amorfo. Por lo tanto, finalmente se eligió el protocolo de secado a 50°C durante 120 minutos seguido de un secado adicional de 5 minutos a 100°C.

Las mezclas a ensayar, se depositaron en microtubos de 2 ml y secadas según el protocolo arriba descrito. Finalmente se incubaron durante 1 ó 150 días en un desecador en presencia de silica gel. Tras la incubación de las muestras en seco se resuspendieron en un 1 ml de Tris HCl 50 mM (pH 8) y 1 ml de solución sustrato como se indica en la sección 6 de *Materiales y métodos*. Posteriormente se realizaron los ensayos de actividad lipasa siguiendo las instrucciones ya descritas. En la figura 10 se muestra la actividad lipasa de la enzima desecada en presencia de cada POB y POBSIA que por tanto denominamos como resultados de xeroprotección (estabilización de la enzima ante la desecación).

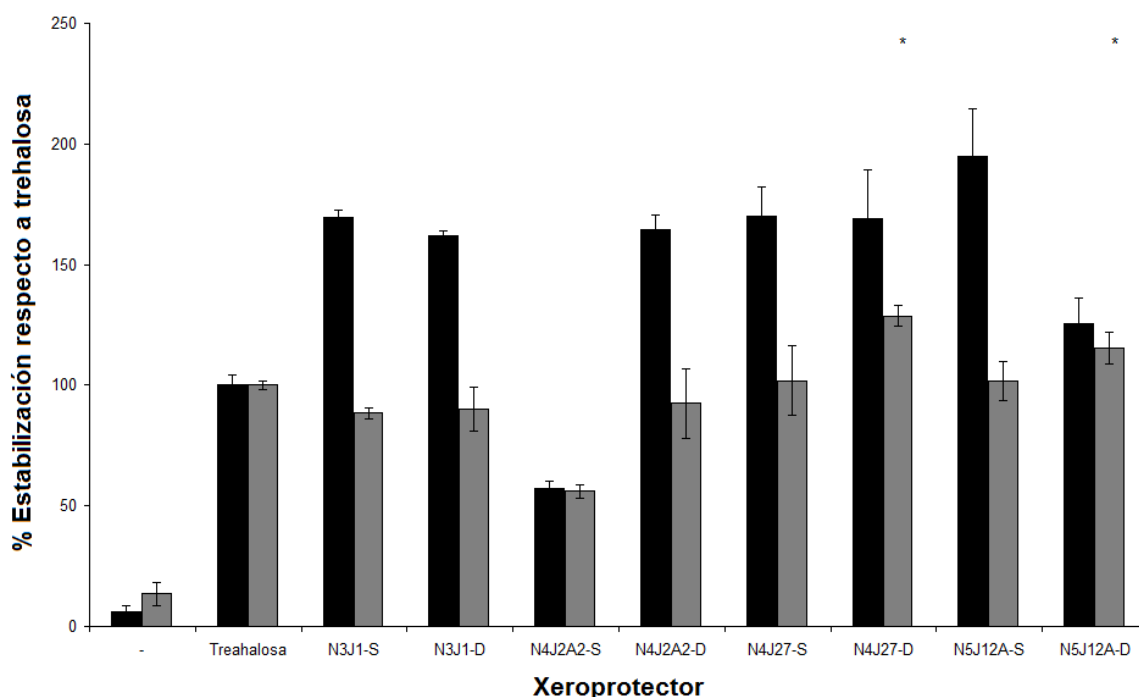


Figura 10 – Actividad lipasa tras deshidratación de la enzima en presencia del 10% (p/v) de diferentes xeroprotectores. Las barras indican el porcentaje de actividad de la lipasa estabilizada en los xeroprotectores aislados respecto al valor obtenido por la lipasa estabilizada en trehalosa, tras 1 día (barras negras) o 150 días (barras grises) del proceso de secado de la enzima. Como control negativo se utilizó agua desionizada, como control positivo una solución de trehalosa al 10% (w/v). Los ensayos se realizaron por triplicado. Las barras de error indican la desviación típica respecto al valor medio. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control positivo.

Tras 1 día de almacenamiento la lipasa estabilizada en cada uno de los xeroprotectores se rehidrató y presentaron un nivel de actividad estadísticamente superiores a la alcanzada por la lipasa estabilizada en agua desionizada (control negativo). Además, y exceptuando la lipasa estabilizada en el POB N4J2A2-S, también mostraron un nivel de actividad estadísticamente superior a la lipasa estabilizada presencia del control positivo de trehalosa al 10% (p/v). El análisis estadístico se basó en el cálculo de la *t*-Student. Igualmente, en el segundo punto de muestreo tras 150 días del proceso de secado de la enzima, todos los POBs y POBSIAs presentaron un efecto de estabilización significativamente superior al registrado por el control negativo basado en el cálculo de la *t*-Student. Sin embargo, solo presentaron niveles de estabilización significativamente superiores respecto al control positivo, las enzimas desecadas en presencia de los xeroprotectores N5J12A-D y N4J27-D tras un estudio basado en el cálculo de la *t*-Student tras 150 días del proceso de secado de la enzima lipasa. Todos los valores registrados para el nivel de actividad lipasa se encontraron dentro del rango de valores de la curva patrón.

1.3.2 – Estabilización de células procariotas con xeroprotectores

Dada la capacidad estabilizadora de la trehalosa sobre algunos microorganismos y una vez determinada que la capacidad estabilizante de algunos de los xeroprotectores aislados era incluso superior a la generada por la misma trehalosa, se decidió determinar la capacidad protectora frente a la desecación generada por cada solución tanto de POB, como de POBSIA sobre células procariotas. Para estos ensayos de protección decidimos emplear la cepa xerosensible *E. coli* MC4100, dado que ya había sido empleada en estudios anteriores de tolerancia a la desecación con xeroprotectores y nos permitía tener un referente (García De Castro et al., 2000; Manzanera et al., 2004b). Para validar el método, se procedió tal y como se describe el ensayo de xeroprotección sobre células procariotas en el apartado 7 de *Materiales y métodos* también utilizado en los estudios mencionados.

Así, se cultivó la cepa *E. coli* MC4100 en alta concentración de sales, para inducir la biosíntesis y bioacumulación endógena de xeroprotectores. En primer lugar se realizó un preinóculo en medio mínimo con glucosa (1M) como única fuente de carbono y a una concentración de NaCl de 0,6 M y se incubó 48 horas a 37°C y 150 rpm. A partir de este preinóculo, se inocularon 15 ml de medio mínimo con glucosa (1M) y con NaCl (0,6 M) hasta obtener una absorbancia inicial de 0,05. Tras esta adición se incubó a 30°C y 150 rpm durante 12 horas y a continuación se centrifugaron alicuotas de 1 ml del cultivo saturado. Para

Resultados – Capítulo 2°

realizar recuentos de células viables sobre placas de TSA para cuantificar la población inicial, las células se resuspendieron en 0,1 ml de las soluciones de los distintos POBs y POBSIAs al 10% (p/v), que se depositaron en viales de vidrio con tapones de goma y se sometieron a un proceso de desecación al vacío a 30°C y 15 mTorr durante 20 horas, seguidas de un secado secundario consistente en una rampa de temperatura de 2,5°C, hasta un máximo de 40°C. Las muestras fueron selladas bajo vacío y almacenadas durante 1, 15 y 30 días a 30°C. Después se resuspendieron en 1ml de caldo LB y se realizaron recuentos de células viables sobre placas de TSA, que por comparación con la población inicial cuantificada con anterioridad permitió determinar el porcentaje de UFC supervivientes. Para *E. coli* MC4100 estabilizada en trehalosa al 10% (p/v), mostró una población inicial de $7 \cdot 10^5$ UFC/ml en el primer punto de muestreo; de $3 \cdot 10^3$ UFC/ml en el segundo punto de muestreo y ninguna UFC en el tercer punto de muestreo. La supervivencia en el primer punto de muestreo fue del 67%, dicha supervivencia se tomó como referencia en cada estudio y por lo tanto se le denominó del 100%.

En la figura 12 se muestran los resultados de dichos ensayos. En esta figura se observa el porcentaje de supervivencia de la cepa de *E.coli* MC4100, tras un proceso de rehidratación. En el primer punto de muestreo, tomado el día posterior al proceso de desecado no se observó supervivencia en ausencia de xeroprotectores, por otra parte ninguno de los xeroprotectores mostró un nivel de estabilización superior al control positivo de trehalosa. No obstante, en los xeroprotectores de todos los aislados se observaron niveles de supervivencia de la cepa *E. coli* MC4100 superiores al observado para el control negativo. Tras 15 días de incubación en ausencia de agua se observó una reducción en la supervivencia de *E. coli* en trehalosa del 25% de la inicial. Además, se observaron niveles de supervivencia superiores a los observados en presencia de trehalosa (control positivo) cuando se secaron en presencia de N4J27-D y N5J12A-D, aunque el cálculo estadístico indicaba que estas diferencias no eran significativas. Sin embargo la supervivencia de *E. coli* secada en N4J27-D y N5J12A-D sí fue significativamente superior a la registrada en trehalosa tras 30 días de incubación según el cálculo basado en la *t*-Student.

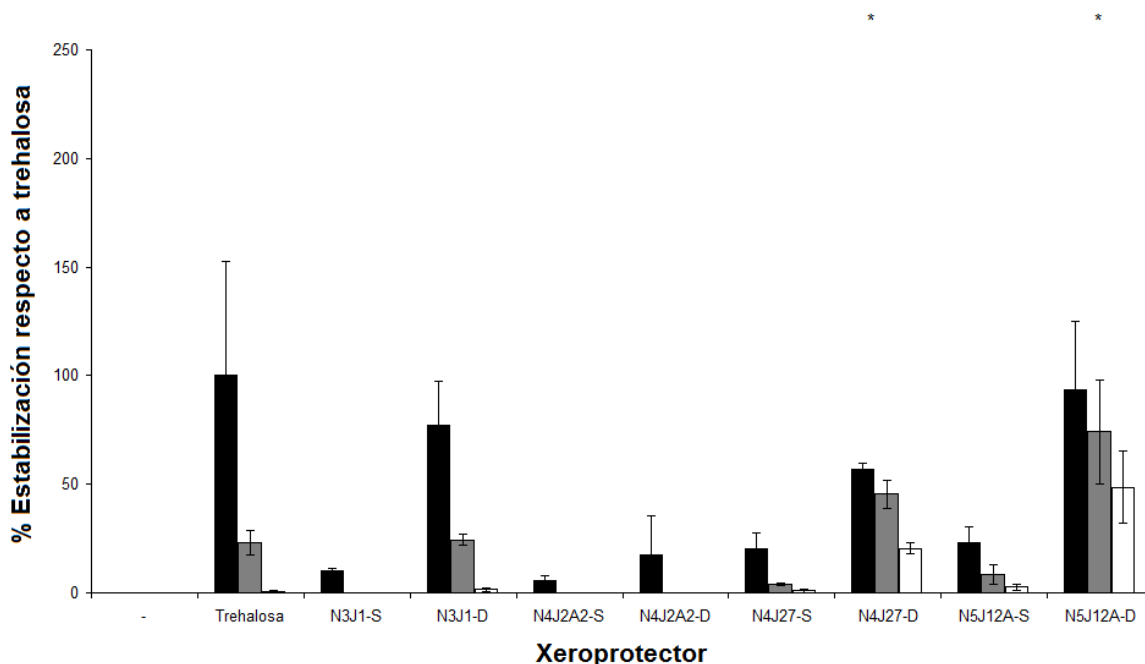


Figura 12 – Viabilidad de *E.coli* MC4100 en presencia de POBs y POBSIAs al 10% (p/v) tras desecación al vacío. Las barras indican la supervivencia de la cepa en presencia de los distintos xeroprotectores respecto al valor obtenido en presencia de trehalosa, tras 1 (barras negras), 15 (barras grises) o 30 (barras blancas) días de almacenamiento. Como control negativo se utilizó agua desionizada, como control positivo una solución de trehalosa al 10% (p/v). Las barras de error indican la desviación típica respecto al valor medio de ensayos realizados por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control positivo tras 30 días de almacenamiento.

1.4 – Caracterización química de POBs y POBSIAs

Con el fin de conocer la composición química que los xeroprotectores, tanto de POBs como de POBSIAs, se realizó su caracterización química siguiendo el protocolo de espectroscopía por Resonancia Magnética Nuclear descrito en el apartado 8 de *Materiales y métodos*.

En la figura 13 aparece un ejemplo de los estudios de identificación realizados para el POB N4J27-D y el POBSIA N4J27-D.

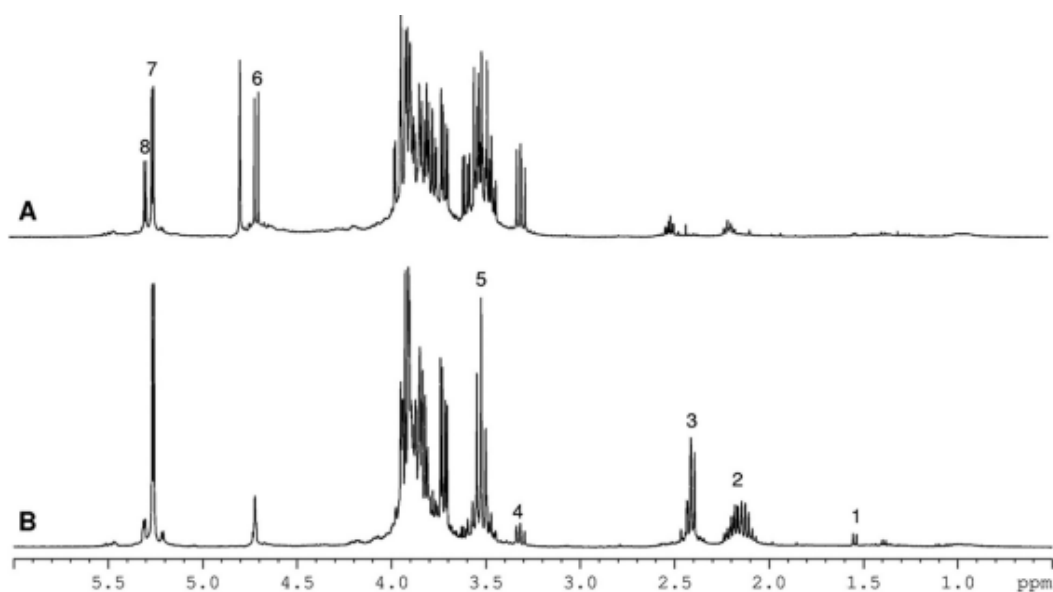


Figura 13 – Espectro ^1H RMN obtenido de los xeroprotectores N4J27-D (A) o N4J27-S (B). Los picos señalados se corresponden con la siguiente composición: 1, alanina; 2, glutamato; 3, glutamina; 4,6 y 8, glucosa; 5 y 7, trehalosa. El área comprendida entre 3.7 y 4 ppm correspondió principalmente a protones de glucosa y trehalosa.

En base a los resultados obtenidos se determinó tanto la composición química como la proporción relativa de cada uno de ellos y que se muestra en la tabla 7. En esta ocasión el nombre del xeroprotector viene precedido de la letra S, que indica su naturaleza sintética. Destaca la variación de la composición del exudado obtenido en función del método de extracción empleado.

Se detectó la presencia de lactato y ácido glutámico en cinco de los xeroprotectores, Por otra lado también se observó la presencia de acetato, glucosa y glutamina en cuatro de los xeroprotectores. También se detectó ácido oxoglucurónico en 3 de los xeroprotectores; así como de fructosa, β -hidroxibutirato, valina y piruvato en 2 de los xeroprotectores. Por último, también se detecto fucosa en uno de los xeroprotectores.

Además en todas las composiciones de POBs y POBSIAs se encontraron macromoléculas de naturaleza polimérica cuya caracterización no fue posible por RMN.

Resultados – Capítulo 2°

Tabla 7 – Composición química relativa de los POBs y POBSIAs.

COMPONENTES	Cantidad relativa (% mol)							
	S4J27-S	S4J27-D	S4J2A2-S	S4J2A2-D	S5J12A-S	S5J12A-D	S3J1-S	S3J1-D
Fructosa	-	-	41	16	-	-	-	-
Ac. glutámico	2	-	2,4	4	-	-	0,14	0,1
Acetato	-	-	1	1	0,1	0,03	-	-
B-Hidroxibutirato	1	-	-	0,8	-	-	-	-
Lactato	-	-	-	1,4	0,25	0,12	1,18	0,62
Glucosa	6,8	2,8	-	-	1	1	-	-
Valina	-	-	-	-	0,37	0,04	-	-
Trehalosa	-	5,8	-	-	-	-	1	1
Oxoglucurónico	1,3	-	-	-	-	-	0,31	0,06
Glutamina	4	1	-	-	-	-	0,28	0,1
Fucosa	-	-	-	-	-	-	2,26	-
Piruvato	-	-	-	-	-	-	0,23	0,1

1.5 – Ensayo de xeroprotección con reproducciones sintéticas

1.5.1- Estabilización de enzimas con xeroprotectores sintéticos por secado

Con objeto de estudiar la capacidad estabilizante de mezclas sintéticas realizada en base a la composición química obtenida por análisis de RMN, se midió la actividad de 5,5 U de la enzima lipasa de *B. cepacia* secada en presencia de 15 µl de mezclas xeroprotectoras al 10% (p/v) y secadas de forma análoga a la descrita en el apartado 6 de *Resultados* que describe el ensayo de xeroprotección de enzimas. Como control positivo se incluyó una solución de trehalosa al 10% (p/v) y agua desionizada como control negativo. La enzima en ese estado se conservó a temperatura ambiente entre 1 y 30 días. Tras este periodo se resuspendió en 15 µl de agua y permaneció en hielo durante 22 minutos hasta el ensayo de su actividad tal y como se describió anteriormente. El nombre de cada mezcla consistió en el nombre de la cepa que produce el xeroprotector natural, seguido de la letra S si se obtuvo por el método estándar o D por el método de desecado al aire, además también van precedidos por la letra S que indica su formulación sintética.

En la figura 14 aparecen reflejados los resultados de dichos ensayos. En esta figura se muestra la actividad lipasa de enzimas desecadas en presencia de cada POB y POBSIA sintéticos. Así en el caso del control negativo se observa que la actividad de la enzima fue significativamente inferior en todos los casos al resto de soluciones en estudio, según el cálculo basado en la *t*-

Resultados – Capítulo 2°

Student tras 1 día de almacenamiento a 30°C.; mientras que en el caso de la enzima desecada en presencia de trehalosa al 10% (p/v) (control positivo) la actividad fue significativamente superior a todos los casos, a excepción de la lipasa estabilizada en presencia de los xeroprotectores S4J2A2-D, S4J27-S y S5J12A-S, según el cálculo basado en la *t*-Student tras 30 días de almacenamiento.

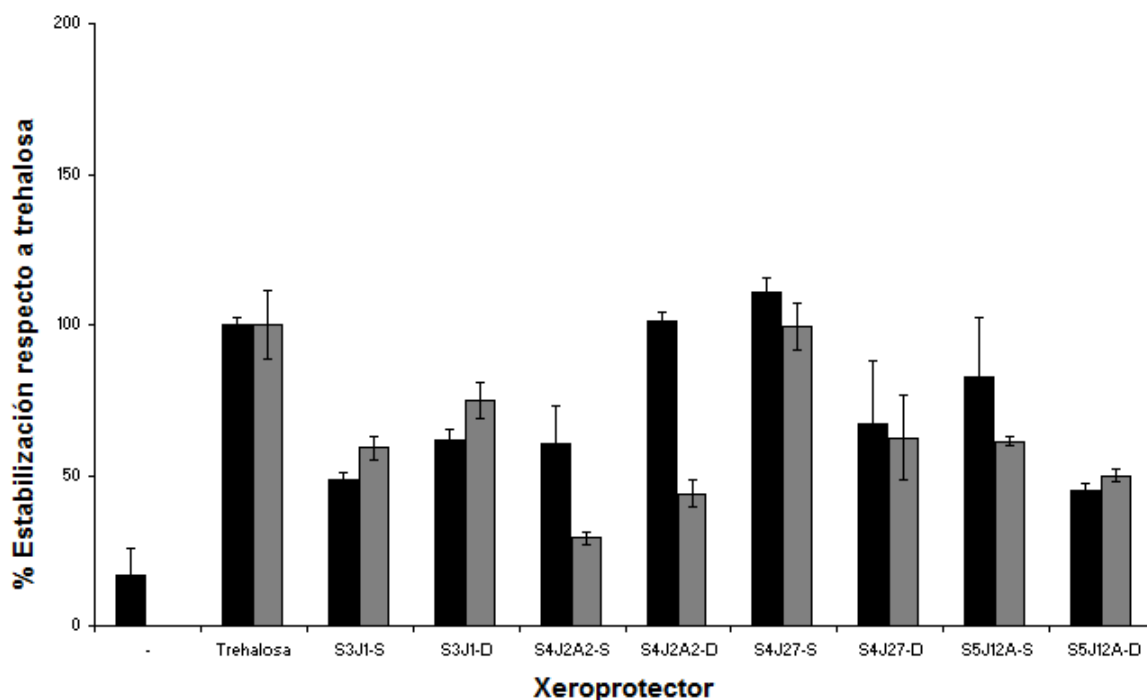


Figura 14 – Actividad lipasa tras deshidratación de la enzima en presencia del 10% (p/v) de diferentes xeroprotectores sintéticos. Las barras indican el porcentaje de actividad de la lipasa estabilizada en los xeroprotectores aislados respecto al valor obtenido por la lipasa estabilizada en trehalosa, tras 1 (barras negras) o 30 días (barras grises) del proceso de secado de la enzima. Como control negativo se utilizó agua desionizada, como control positivo una solución de trehalosa al 10% (p/v). Los ensayos se realizaron por triplicado. Las barras de error indican la desviación típica respecto al valor medio.

Se realizó el mismo tratamiento estadístico para encontrar diferencias significativas del nivel de actividad de la lipasa desecada, en presencia de los xeroprotectores sintéticos formulados respecto al control positivo de trehalosa al 10% (p/v) y agua desionizada, tras 30 días de almacenamiento a 30°C. Este estudio estadístico reveló diferencias significativas del nivel de actividad lipasa estabilizada en presencia de todos los xeroprotectores sintéticos respecto al control negativo en ausencia de xeroprotector, salvo para la lipasa en S4J2A2-S. Respecto al control positivo de trehalosa, solo el POB sintético S4J27-S no mostró un nivel de estabilización significativamente menor que el control positivo de trehalosa. También se calculó si existieron diferencias significativas en el nivel de estabilización entre los dos

puntos de muestreo. Todas las soluciones xeroprotectoras mantuvieron estable el nivel de actividad lipasa salvo S4J2A2-S y S4J2A2-D. Es necesario destacar que todos los valores de actividad lipasa se encontraron dentro los valores registrados para la curva patrón.

1.5.2 – Estabilización de células procariotas con xeroprotectores sintéticos

Se decidió estudiar la capacidad estabilizadora de las formulaciones sintéticas sobre células vivas, de manera análoga a la escrita en el apartado anterior. Nuevamente se recurrió a la cepa *E. coli* MC4100 con la que se reprodujeron los ensayos de estabilización de las mezclas sintéticas de la tabla 9. Para ello, se tomaron fracciones alicuotas de 1 ml de un cultivo de *E. coli* MC4100 cultivado en medio mínimo con glucosa 1M y una concentración de NaCl 0,6 M. Tras su centrifugado a 13.500 rpm, el precipitado celular se resuspendió en 100 µl del xeroprotector sintético y se realizó el proceso de desecado como se describió en el apartado 7 de *Materiales y métodos*. En la figura 15 aparecen reflejados los resultados de dichos ensayos. En esta figura se muestra la supervivencia de la cepa *E. coli* MC4100 desecada en presencia de cada POB y POBSIA sintéticos. Para *E. coli* MC4100 se estabilizó en trehalosa al 10% (p/v), mostró una población inicial de $6 \cdot 10^5$ UFC/ml en el primer punto de muestreo; de $4 \cdot 10^3$ UFC/ml en el segundo punto de muestreo y de 23 UFC en el tercer punto de muestreo.

El análisis estadístico basado en el cálculo de la *t*-Student mostró que en el primer punto de muestreo, efectuado el día posterior al proceso de desecado, sólo el POBSIA S4J2A2-D presentó un nivel de estabilización significativamente superior al control positivo. Los xeroprotectores S4J2A2-S, S4J27-S y S4J27-D presentaron niveles similares al mostrado por el control positivo, mientras que los xeroprotectores S3J1-S, S3J1-D y S5J12A-S presentaron niveles de supervivencia de la cepa inferiores al presentado en trehalosa. No obstante todos los xeroprotectores mostraron niveles de estabilización significativamente superiores respecto al control negativo. Tras 15 días del proceso de desecado, los POBSIAs sintéticos S4J2A2-S, S4J2A2-D y S4J27-D presentaron niveles de supervivencia de la cepa significativamente superiores al control positivo de trehalosa y al control negativo. Al día 30 solo se registró supervivencia de la cepa cuando fue estabilizada en presencia de los xeroprotectores S4J2A2-D y S4J27-D.

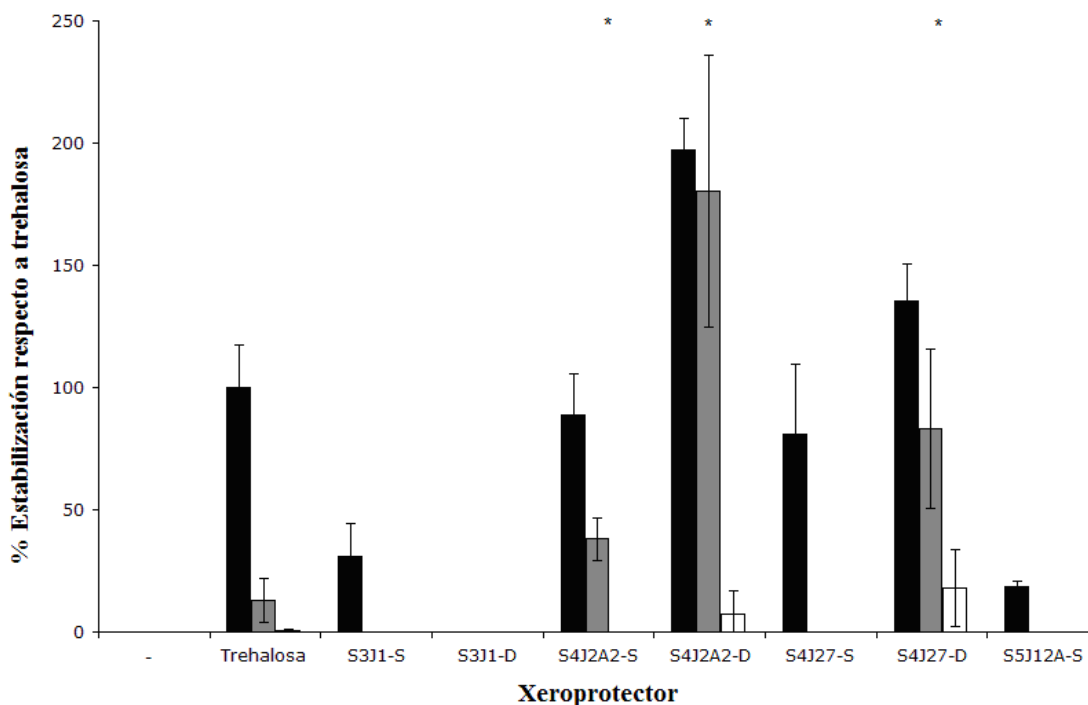


Figura 15 – Viabilidad de *E.coli* MC4100 en presencia de xeroprotectores sintéticos al 10% (p/v) tras desecación al vacío. Las barras indican la supervivencia de la cepa en presencia de los distintos xeroprotectores respecto al valor obtenido en presencia de trehalosa, tras 1 (barras negras), 15 (barras grises) o 30 (barras blancas) días de almacenamiento. Los nombres de los diferentes exudados resumen el nombre del procedimiento de obtención. Como control negativo se utilizó agua desionizada, como control positivo una solución de trehalosa al 10% (p/v). Los ensayos se realizaron por triplicado. Las barras de error indican la desviación típica respecto al valor medio. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al control positivo tras 15 días de almacenamiento.

1.6 - Comparación del efecto xeroprotector entre xeroprotectores naturales y sintéticos

Dado que los estudios con xeroprotectores naturales y sintéticos se realizaron con los mismos modelos experimentales pero en distintos tiempos decidimos realizar un estudio comparativo en el mismo tiempo. Así, se utilizó la misma metodología empleada en los ensayos anteriores y descrita en el apartado 6 de *Materiales y métodos* sobre el ensayo de xeroprotección de enzimas, utilizando como control positivo una solución de trehalosa al 10% (p/v) y como control negativo agua desionizada. La figura 16 muestra los resultados obtenidos. Los nombres de los diferentes exudados resumen el nombre del procedimiento de obtención. Seguidos de la letra -D si fueron obtenidos por secado al aire (POBSIA). Si van sucedidos de la letra -S, obtenidos ante estrés osmótico (POB). Precedidos de la letra S- indica que fueron producidos de forma sintética y por la letra N- indica su origen natural.

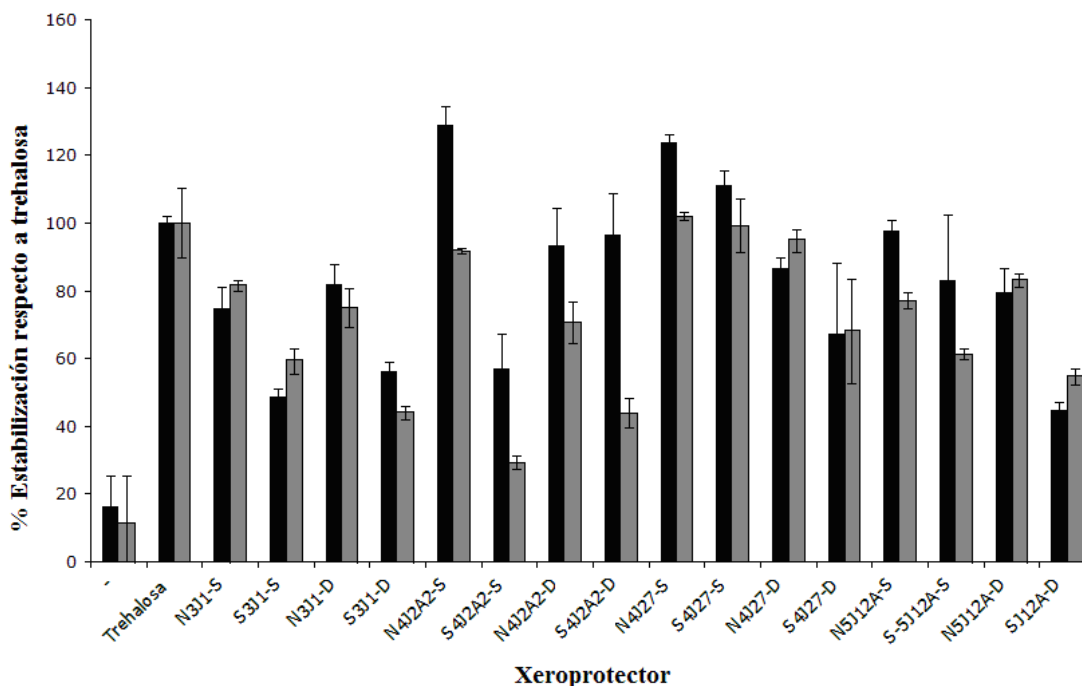


Figura 16 – Comparativa de la actividad lipasa tras deshidratación de la enzima en presencia del 10% (p/v) de diferentes xeroprotectores naturales y producidos de forma sintética, a día 1 (barras negras) o día 30 (barras grises). Las barras indican el porcentaje respecto a la actividad lipasa obtenida por estabilización en trehalosa. Como control negativo se utilizó agua desionizada, como control positivo una solución de trehalosa al 10% (p/v).

Como muestra la figura 16, a excepción de los xeroprotectores N4J27-S y S4J27-S, en todos los demás casos el nivel de estabilización conseguido por los xeroprotectores naturales fue superior a sus equivalentes sintéticos, tras 30 días de almacenamiento. Esta situación indica la presencia en los POBs y POBSIAs naturales de otras moléculas con un papel relevante en el protocolo de estabilización.

1.7 - Caracterización de otras moléculas en los xeroprotectores naturales.

Tal y como se ha indicado en el apartado anterior, aunque las composiciones sintéticas en base a POBs y POBSIAs sintéticos pueden generar niveles de estabilización similares a los generados por trehalosa, en términos generales son inferiores a los que alcanzan los POBs y POBSIAs naturales. Por otra parte y dado que se han identificado macromoléculas poliméricas de naturaleza desconocida en los ensayos de RMN, decidimos realizar un estudio espectrofotométrico de los compuestos naturales desde 260 nm a 280 nm, para ellos reutilizaron 1 µl y se analizaron en un espectrofotómetro (Nanodrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific), observándose un pico de absorción entre 250 y 270 nm coincidente con los picos de absorción de los ácidos nucleicos. Así decidimos estudiar si estas macromoléculas

podían corresponderse con la presencia de ácidos nucleicos. La tabla 8 resume los resultados obtenidos.

Tabla 8 – Análisis espectrofotométrico de los xeroprotectores.

Xeroprotector/absorbancia	260 nm	280 nm	260/280	260/230
N3J1-S	9,03	4,48	2,02	0,54
N4J2A2-S	19,83	9,69	2,05	0,72
N4J27-S	19,28	10,06	1,92	0,97
N5J12A-S	20,585	10,789	1,91	0,98

Como se observa en la tabla 8, se detectaron las mayores absorbancias a 260 nm, en los xeroprotectores N4J2A2-S, N4J27-S y N5J12A-S, longitud de onda a la que se detecta el ADN. No obstante, el coeficiente 260/230 presentó valores por debajo de 2 sugiriendo la presencia de moléculas de naturaleza polimérica que podrían desvirtuar los resultados obtenidos de absorbancia a 260 nm. Los resultados del coeficiente 260/280 se encuentran en todos los casos por encima de 1,8, descartando posibles alteraciones de la absorbancia a 260 nm como consecuencia de elevadas concentraciones de proteínas en los xeroprotectores.

A continuación se realizó un análisis de los POBs N3J1-S, N4J2A2-S, N4J27-S y N5J12A-S preparados a una concentración del 10% (p/v) sometiendo a electroforesis 3 μ l de los mismos en gel de agarosa al 0,7 %. Como se observa en la figura 17, en todos los POBs se observó presencia de moléculas con capacidad de unirse al bromuro de etidio, y que proponemos que podrían corresponderse con ácidos nucleicos. En el caso de las muestras correspondientes a los POBs N4J27-S y N5J12-S, estas presentaron una gran concentración de dichas moléculas con una abundancia especial entre las bandas de 0,5 y 3 kb del marcador de peso molecular. Para el POB N3J1-S se apreció una presencia de moléculas muy inferior; mientras que para el POB N4J2A2-S se observó una banda especialmente intensa en el pocillo del gel.

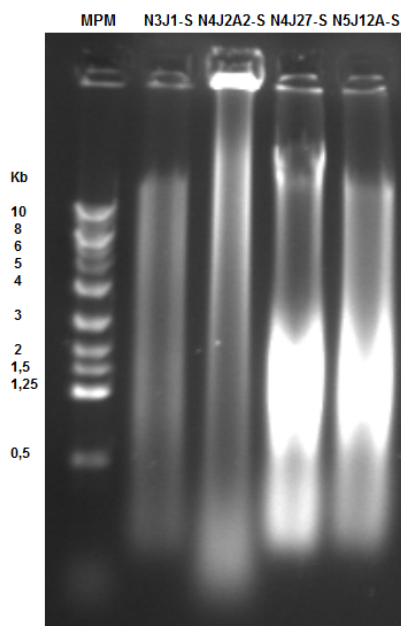


Figura 17 - Electroforesis de los POBs aislados. Se sometió a electroforesis 3 μ l de cada POBs preparado al 10% (p/v). MPM es el marcador de peso molecular de 10 kb de MBL.

Para corroborar si las moléculas con capacidad para teñirse con bromuro de etidio consistían en ácidos nucleicos, se realizaron dos tratamientos consecutivos con DNasa I y RNasa de los POBs. Con este fin se aislaron y purificaron las moléculas con capacidad de teñirse con bromuro de etidio presentes en el POB N4J27-S preparado al 10% (p/v). Para este aislamiento se siguió el protocolo de minipreparación de ADN total, descrito en el apartado 4.1 de *Materiales y métodos* basado en el tratamiento con fenol:cloroformo:isoamil alcohol. Al finalizar el proceso de purificación, se analizó espectrofotométricamente y registrándose una absorbancia a 260 nm de longitud de onda de 19,2 y a 280 nm de 10, y por lo tanto una relación 260/280 de 1,9 y 260/230 de 2,1. A continuación se prepararon dos muestras de 49 μ l de tampón de reacción 1x mezclando 9 partes de agua y una parte de NE Buffer para DNase I [10x] (New England Biolab, BO33035). Cada una se mezcló con 1 μ l de del producto purificado con el tratamiento con Fenol:cloformo:Alcohol isoamílico y a una de las muestras se le añadió 0,5 μ l de ADNasa (DNase I; M03035; 2.000 U/ml; New England Biolab) y la otra con 0,5 μ l de agua desionizada. Las mezclas se agitaron suavemente y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. A ambas muestras se les añadió 0,5 μ l de EDTA (0,5 M). Finalmente las muestras fueron inactivadas mediante incubación a 75°C durante 10 minutos. Como se muestra en la figura 14, tras el tratamiento con ADNasa I la banda de ácidos nucleicos se redujo respecto a su equivalente con ADNasa I. Ambas bandas fueron tratadas con 1 μ l de ARNasa (9 U) e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente. En la figura 18 se muestra el resultado del tratamiento con ARNasa sobre las bandas del gel. Así, se observó como

Resultados – Capítulo 2º

desaparece el ácido nucleico restante de la segunda calle, lo que parece indicar que estas moléculas con capacidad de unirse al bromuro de etidio están constituídas principalmente de ADN con restos de ARN.

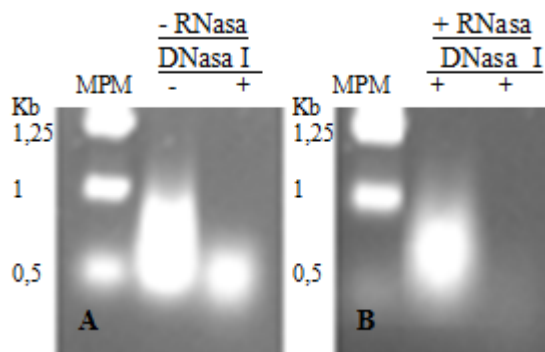


Figura 18 – Tratamiento con ADNasa I y ARNasa de la extracción fenólica del xeroprotector N4J27-S. A): marcador de peso molecular (MPM); ácido nucleico aislado de N4J27-S (1); ácido nucleico aislado de N4J27-S tratado con ADNasa I (Verdoy D). B) De izquierda a derecha: MPM; banda de 1 tratada con ARNasa (1.1); banda de 2 tratada con ARNasa (2.2). En todas las calles se sometieron 3 μ l a electroforesis.

1.7.1 – Estabilización de proteínas con POBs naturales en ausencia de ADN

En función de los resultados expuestos en el apartado anterior, decidimos estudiar si los POBs N4J27-S y N5J12A-S mantenían el nivel de estabilización de proteínas en ausencia de ADN. Se seleccionaron estos POBs por ser aquellos a los que se produjo una mayor absorbancia a la longitud de onda de 260 nm. De nuevo se eligió a la enzima lipasa como proteína modelo para los estudios de estabilización por secado.

Con objeto de eliminar el ADN de 60 μ l de los POBs naturales preparados al 10% (p/v) se añadieron 2U de ADNasa I (2.000 U/ml) (M03035; New England Biolab) y 1 μ l de $MgCl_2$ 25 mM (MBL ANO1081). Dado que la inclusión de ADNasa I podría suponer una alteración en la proporción de moléculas xeroprotectoras por molécula de proteína, se incluyó un control paralelo en el que a la mezcla de xeroprotector y lipasa se le añadió un volumen de 1 μ l de seroalbúmina bovina (BSA) (B9001S; Biolabs), con una concentración de 10 mg/ml, equivalente a la concentración de ADNasa I añadido en el primer caso. A la mezcla también se añadió la misma cantidad de $MgCl_2$ [25 mM] que en el primer caso. Además para descartar que las posibles variaciones en el nivel de estabilización de la lipasa, se debieran a interacciones negativas entre el xeroprotector y el $MgCl_2$, se introdujo un control con una

Resultados – Capítulo 2º

solución del xeroprotector al 10% (p/v) adicionado de 1 μ l de $MgCl_2$ 25 mM. Las mezclas se incubaron durante 3 horas en frío y luego se realizó el ensayo de xeroprotección de enzimas descrito en la sección 6 de *Materiales y métodos*. También se incluyó un control de trehalosa al 10% (p/v) sometida a los mismos tratamientos de $MgCl_2$, ADNasa I en presencia de $MgCl_2$ 25mM y BSA en presencia de $MgCl_2$ 25mM que los POBs en estudio. También se incluyó como control negativo agua desionizada sin ningún tipo de tratamiento.

Como se puede apreciar en la figura 19, la lipasa estabilizada en los POBs N4J27-S y N5J12A-S tratados con ADNasa I, mostró un nivel de actividad similar al control negativo de agua desionizada; mientras que la lipasa estabilizada en los mismos POBs tratados con BSA o sin ADNasa I, presentó un nivel de actividad significativamente superior al control negativo, según el cálculo basado en la *t*-Student. Por otro lado la lipasa estabilizada en los distintos tratamientos de trehalosa presentó un nivel de actividad similar y también significativamente superior al control negativo de agua desionizada, también basado en el cálculo de la *t*-Student.

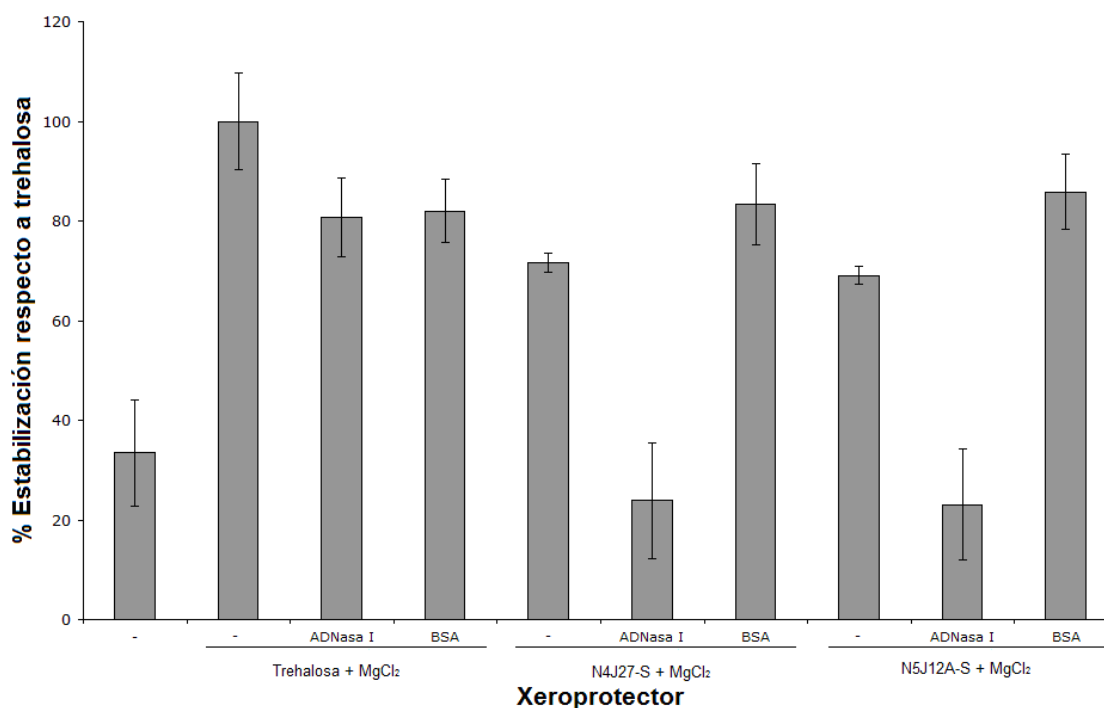


Figura 19 - Actividad lipasa tras desecación de la enzima en presencia de POBs tratados con ADNasa I. En abscisas se muestran los tratamientos realizados previos a la retirada de agua de la enzima y que incluyen Trehalosa + $MgCl_2$; N4J27-S + $MgCl_2$ y N5J12A + $MgCl_2$ tanto en presencia de ADNasa I como de BSA o sin aditivo adicional. También se incluye un control negativo (-) sin aditivo alguno. Los ensayos se realizaron por triplicado. Las barras de error indican la desviación típica respecto al valor medio de actividad.

1.7.2 – ADN como xeroprotector

Una vez evaluada la importancia del ADN presente en los POBs N4J27-S y N5J12A-S para la estabilización por secado de lipasa, decidimos comprobar la capacidad estabilizadora del ADN añadido de forma exógena como xeroprotector de la misma enzima. Para ello se procedió a la obtención y purificación del ADN presente en los POBs N4J27-S y N5J12A-S preparados al 10% (p/v). Se siguió el protocolo de minipreparación de ADN total descrito en el apartado 4.1 de *Materiales y métodos* basado en el tratamiento con fenol:cloroformo:isoamil alcohol. Al finalizar el proceso de purificación, se analizó espectrofotométricamente el ADN obtenido a partir de los POBs. En ambos casos se trabajó con una concentración de ADN de 750 ng/μl y se observó una relación en la absorbancia 260/280 de 1,86 para N4J27-S y 1,93 para N5J12A; así como el coeficiente 260/230 presentó valores de 2,17 y 2,09 respectivamente. A las soluciones de ADN obtenido a partir de los POBs N4J27-S y N5J12A-S se les denominó A4J27-S y A5J12A-S respectivamente. La lipasa en presencia de las distintas soluciones de ADN se desecó siguiendo el protocolo habitual, por incubación en termobloque a 50°C durante 120 minutos seguido de un secado adicional a 100°C durante 5 minutos. A continuación se realizó el ensayo de xeroprotección de lipasa descrito en la sección 6 de *Materiales y métodos*. Como control positivo se incluyó una solución al 10% (p/v) de trehalosa y como control negativo una solución de agua desionizada. Con el objetivo de conocer si esta propiedad era exclusiva del ADN aislado de xeroprotectores naturales decidimos incluir en los ensayos de estabilización y ADN total extraído de las mismas cepas de donde se extrajeron los POBs. Además, y para comprobar si era una característica exclusiva y propia de estas cepas se procedió a obtener ADN total de *P. putida* KT2440 como control de ADN de una cepa no xerotolerante. Así pues, se realizó una extracción de ADN total, como indica el apartado 4.1 de *Materiales y métodos*, de las cepas *Arthrobacter* sp 4J27, *Arthrobacter* sp 5J12A y *Pseudomonas putida* KT2440 que denominamos respectivamente como T4J27 y T5J12A y KT2440. A partir de esas extracciones, se prepararon soluciones de las mismas con una concentración también de 750 ng/μl de ADN y se incluyeron 15 μl como únicos xeroprotectores en el ensayo de xeroprotección de lipasa. En la figura 20 se observan los resultados obtenidos.

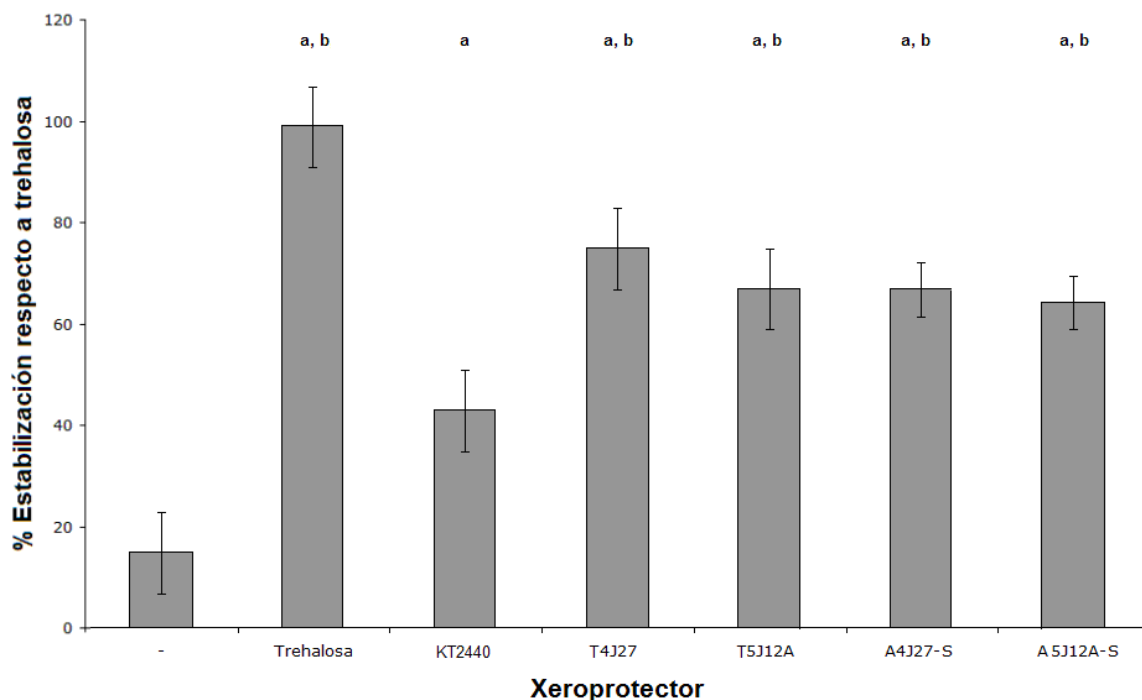


Figura 20 – Xeroprotección de lipasa en presencia de distintas soluciones de ADN utilizadas. De izquierda a derecha: -, agua desionizada como control negativo; Trehalosa al 10% (p/v) como control positivo; KT2440, ADN total de *P. putida* KT2440; T4J27, ADN total de *Arthrobacter* sp 4J27; T5J12A, ADN total de *Arthrobacter* sp 5J12A; A4J27-S, ADN aislado del POB N4J27-S; A5J12A-S, ADN aislado del POB N5J12A-S. Todas las soluciones de ADN se prepararon a una concentración de 750 ng/μl. Las barras indican el nivel de actividad de la lipasa tras el proceso de secado en las distintas soluciones. Los ensayos se realizaron por triplicado. Las barras de error indican la desviación típica sobre el valor medio. Las letras a indican diferencias respecto al control negativo y la letra b diferencias significativas con respecto a KT2440.

Como se observa en la figura 20, la lipasa estabilizada en todas las soluciones de ADN presentó un nivel de actividad significativamente superior al control negativo, según el cálculo basado en la *t*-Student tras el proceso de secado. Se observaron diferencias significativas entre el nivel de actividad registrado para la lipasa estabilizada en las soluciones de ADN total y del ADN aislado de los POBs. Por otra parte se observó un mayor nivel de estabilización cuando se utilizó ADN procedente de las cepas xerotolerantes que en ADN procedente de *P. putida* KT2440. Por otro lado la lipasa estabilizada en presencia de trehalosa al 10% (p/v), mostró un nivel de actividad significativamente superior al resto de soluciones ensayadas.

1.7.3 – Origen del ADN presente en los POBs

Con el fin de determinar si el ADN presente en los POBs N4J27-S y N5J12A-S, era sintetizado y bioacumulado por las cepas *Arthrobacter* sp 4J27 y *Arthrobacter* sp 5J12A ante situaciones de estrés osmótico; o si por el contrario se trataba de ADN total liberado por fenómenos de lisis celular durante el procedimiento de obtención, se evaluó el nivel de lisis celular así como la concentración de ADN producida.

Resultados – Capítulo 2°

Con este objetivo, se obtuvieron los xeroprotectores N4J27-S y N5J12A-S según el protocolo descrito en el apartado 2.2.1 del presente capítulo, mediante incubación a las concentraciones de NaCl óptima y máxima tolerada por las cepas en estudio. Para obtener N4J27-S se incubó a *Arthrobacter* sp 4J27 en medio mínimo en presencia de una concentración óptima de 0,8 M y seguido de un aumento a la máxima concentración de NaCl tolerada de 1,6 M; mientras que para obtener N5J12A-S se incubó a *Arthrobacter* sp 5J12A en medio mínimo con una concentración de 0,2 M como concentración de NaCl óptima y de 0,8 M como concentración de NaCl máxima tolerada. Una vez seguido el proceso de obtención de POBs, con estos xeroprotectores se prepararon soluciones al 10% (p/v) y se estimó la concentración de ADN espectrofotométricamente según el procedimiento descrito en el apartado 4.7 de *Materiales y métodos*. Cuando *Arthrobacter* sp 4J27 se cultivó en presencia de la concentración de NaCl óptima para obtener el POB N4J27-S, este producto de ordeñado bacteriano presentó una concentración de ADN de 800 ng/μl. Por otra parte, cuando *Arthrobacter* sp 4J27 se cultivó en presencia de la concentración de NaCl máxima tolerada por la cepa, se obtuvo un POB que suspendido al 10% (p/v) presentaba una concentración de ADN de 2.700 ng/μl. En el caso de *Arthrobacter* sp 5J12A se registró una concentración de 250 ng/μl de ADN cuando la concentración de NaCl empleada para su cultivo fue la óptima y 400 ng/μl de ADN cuando se empleó la concentración máxima de NaCl para su cultivo. Con objeto de evaluar la integridad celular de los cultivos utilizados durante el proceso de obtención de estos POBs, de forma paralela se realizaron recuentos de supervivencia de las células a lo largo del proceso de obtención. De los POBs concretamente se realizaron siembras en placas de TSA de diluciones seriadas antes de centrifugar los cultivos y después de resuspender el precipitado celular rico en xeroprotectores en agua destilada. Con el resultado de ambos conteos se determinó el porcentaje de lisis celular, como el número de UFC/ml tras resuspender las células en agua destilada dividido por el número de UFC/ml antes de centrifugar los cultivos y multiplicado por 100. En la figura 21 se observan los resultados obtenidos.

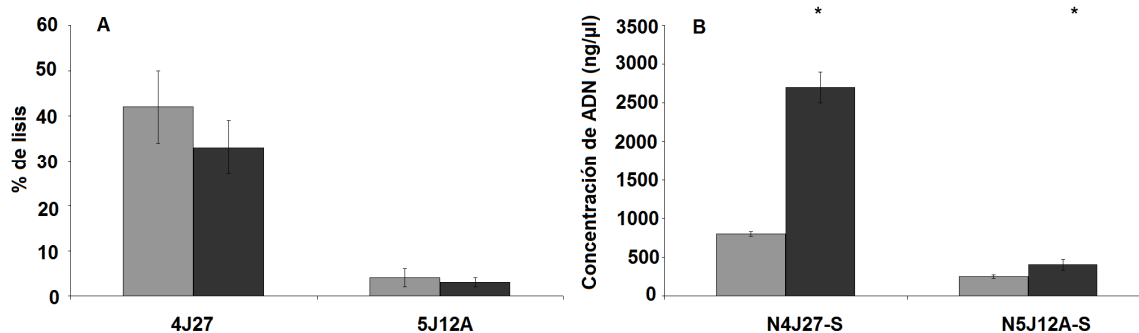


Figura 21 – Porcentaje de lisis celular a distintas concentraciones osmóticas y concentración de ADN en el xeroprotector. Las barras indican los resultados obtenidos a concentración óptima (gris) y máxima tolerada (negro). A) Lisis celular de las cepas *Arthrobacter* sp 4J27 (4J27) y *Arthrobacter* sp 5J12A (5J12A) tras resuspender el precipitado bacteriano rico en POBs en agua destilada. B) Concentración de ADN en los POBs N4J27-S y N5J12A-S. Los ensayos se realizaron por triplicado. Las barras de error indican la desviación típica sobre el valor medio. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los resultados obtenidos a concentración de NaCl óptima y máxima tolerada por las cepas.

Tal y como se observa en la figura 21, el porcentaje de lisis celular era similar independientemente de la concentración de NaCl empleada para el cultivo de cada una de las cepas, no observándose diferencias significativas ni para *Arthrobacter* sp 4J27 ni para el caso de *Arthrobacter* sp 5J12A. Sin embargo, la concentración de ADN en los POBs producidos a máxima concentración de NaCl fue significativamente superior a los producidos a concentración óptima, lo que quedó constatado en base al cálculo de la *t*-Student.

1.7.4 – Modulación de reacciones de Maillard por ADN bacteriano

Para dar respuesta a por qué la lipasa estabilizada por secado en los xeroprotectores en presencia de ADN alcanzaba mayor nivel de actividad, se estudió si el ADN podría atenuar las reacciones de Maillard las cuales, se describen en el apartado 4.1.3.1 de la *Introducción* y pueden ser causa de inactivación de proteínas en los procesos de desecación. Para ello se realizó el ensayo de modulación de reacciones de Maillard descrito en el apartado 9 de *Materiales y métodos*, consistente en determinar la absorbancia a 410 nm de los cristales amorfos, producidos a partir de la lipasa presente en las soluciones en estudio tras desecación a 50°C en termobloque durante 120 minutos y solubilizado en Tris HCl 0,05 M y pH 8. Con este fin se formuló una solución de glucosa y glutamina (1:1) al 10% (p/v) a la misma concentración que denominamos GlucGln. Esta solución tras el proceso de secado y posterior rehidratación da lugar a intensas reacciones de Maillard, así esta mezcla se utilizó como control positivo y como control negativo se utilizó agua desionizada que no produce reacciones de Maillard. De forma paralela se formuló la misma mezcla pero adicionada con

Resultados – Capítulo 2°

ADN total de *Arthrobacter* sp 4J27 (T4J27) a una concentración de 2,5 µg/µl y otra con ADN total de *Arthrobacter* sp 5J12A (T5J12A) a la misma concentración. Estas soluciones se secaron siguiendo el protocolo arriba indicado y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se resuspendieron en 1 ml y se cuantificó su absorbancia a una longitud de onda de 410 nm. Los resultados del análisis colorimétrico se observan en la figura 22.

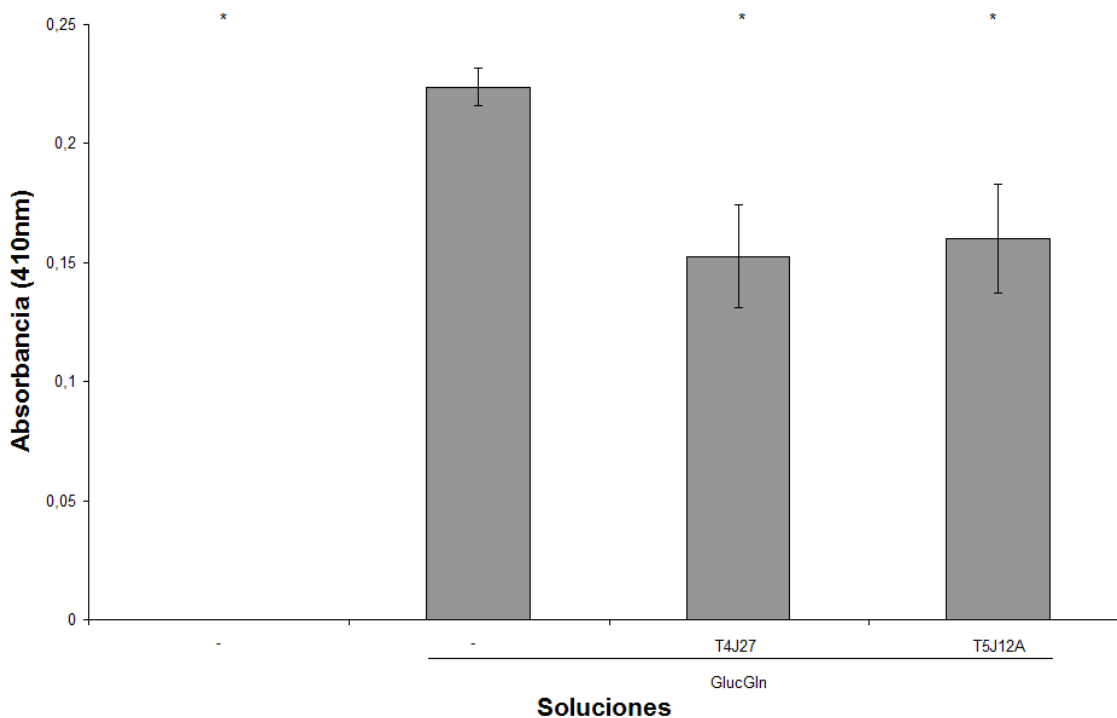


Figura 22 – Absorbancia a 410 nm de longitud de onda provocada por las reacciones de Maillard. Se muestra la absorbancia (410 nm) de una solución de glucosa y glutamina 1:1 al 10% (GlucGln) y de esta solución en presencia de 2.500 ng/µl de ADN total de *Arthrobacter* sp 4J27 (T4J27); y de *Arthrobacter* sp 5J12A (T5J12A). También se incluye la absorbancia de agua desionizada sometida al mismo proceso de secado y posterior rehidratación de las distintas soluciones. Los ensayos se realizaron por triplicado. Las barras de error indican la desviación típica sobre el valor medio. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control positivo.

Para conocer si las diferencias fueron significativas se aplicó un estudio estadístico basado en el cálculo de la *t*-Student. Como era de esperar no se observó aumento en la absorbancia del control negativo lo que contrasta con la alta absorbancia registrada para la mezcla de glucosa y glutamina de aproximadamente 0,23. Como se observa en la figura 22, las mezclas adicionadas con ADN total aislado tanto de *Arthrobacter* sp 4J27 y *Arthrobacter* sp 5J12A presentaron una coloración significativamente inferior al control positivo.

1.8 – Mejora del POB S4J2A2-D

Dado que hasta el momento el xeroprotector S4J2A2-D fue la mezcla sintética que había presentado los mejores resultados para la estabilización de proteínas por secado, nos propusimos estudiar si la adición de ADN a este xeroprotector podría mejorar sus propiedades xeroprotectoras para lo que se le añadieron distintas cantidades de ADN de distintos orígenes.

Con objeto de estudiar si las reacciones de Maillard se veían atenuadas por la presencia de ADN procedente de microorganismos xerotolerantes o si por el contrario este es un efecto común a otros tipos de ADN, así como si el nivel de protección es proporcional a la concentración del ADN, se ensayó si distintas concentraciones de ADN de esperma de pescado (SIGMA 74782) también podría atenuar las reacciones de Maillard. Previamente a este estudio nos propusimos calcular la máxima concentración soluble de ADN de esperma de pescado para lo que se realizó una curva patrón con concentraciones crecientes de este soluto. Se disolvieron concentraciones crecientes de ADN de esperma de pescado en agua destilada y se observó que a partir de una concentración de 23 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADN de esperma de pescado este precipitaba. Una vez calculado que la concentración máxima a la que el ADN de esperma de pescado es soluble se utilizó el procedimiento descrito en el apartado 9 de *Materiales y métodos*, y se formuló la mezcla de glucosa y glutamina 1:1 al 10% (p/v) (GlucGln) que produce intensas reacciones de Maillard de nuevo. A esta solución de glucosa y glutamina se le añadieron 150; 1.500; 15.000 y 23.000 $\text{ng}/\mu\text{l}$ de ADN de esperma de pescado. A continuación las muestras se secaron durante 120 minutos a 50°C. Una vez formado el cristal amorfo y tras incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, las muestras se disolvieron en 1 ml de Tris-HCl, 0,05 M a pH 8 y se determinó la absorbancia. La figura 23 muestra los resultados obtenidos de las distintas mezclas tras procesos de secado y resuspensión.

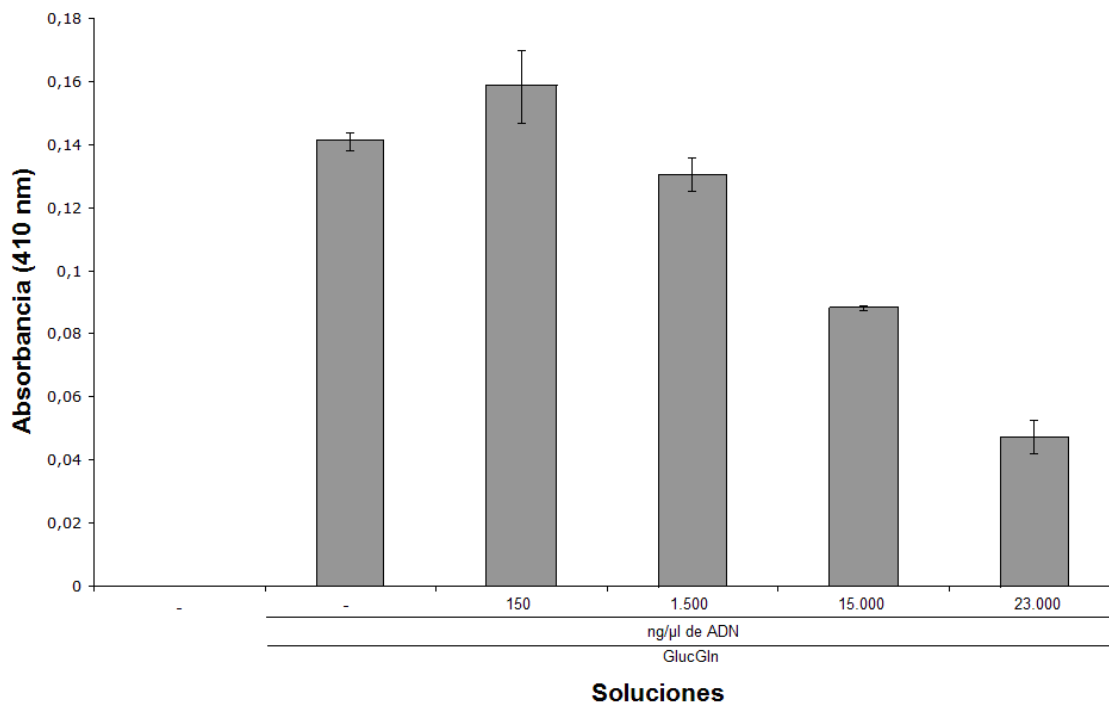


Figura 23 – Reacciones de Maillard en presencia de distintas concentraciones de ADN. Se muestra la absorbancia (410 nm) de soluciones de glucosa y glutamina (1:1) (p/v) (GlucGln), adicionada con distintas concentraciones de ADN de pescado (0, 150, 1.500, 15.000 y 23.000 ng/μl) tras el secado y posterior rehidratación de las soluciones. Las barras indican la absorbancia a 410 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado. Las barras de error indican la desviación típica sobre el valor medio.

Como se observa en la figura 23, la máxima atenuación de las reacciones de Maillard a la absorbancia a 410 nm, se registró cuando la muestra de glucosa y glutamina se encontraba en presencia de la concentración máxima soluble de ADN de pescado (23.000 ng/μl).

Una vez identificado que el ADN de pescado podía atenuar las reacciones de Maillard y la concentración a la que se produce la máxima atenuación, se decidió estudiar si se podía mejorar la capacidad estabilizadora de proteínas generadas por el xeroprotector S4J2A2-D. Con este fin se realizó el ensayo de xeroprotección de enzimas utilizando el modelo basado en lipasa ya descrito anteriormente y utilizando como xeroprotector a S4J2A2-D adicionado con ADN de pescado a la concentración de 23 μg/μl. Nuevamente se utilizaron 5,5 U de lipasa que se secaron durante 120 minutos a 50°C y seguido de un secado secundario a 5 minutos a 100°C, tras lo cual se almacenaron en desecador a temperatura ambiente durante 1 ó 30 días. Transcurrido este periodo las muestras se resuspendieron en 1 ml de Tris HCl 0,05 M y pH 8 y se utilizaron para ensayos de lipasa. En la figura 24 se muestran los resultados obtenidos.

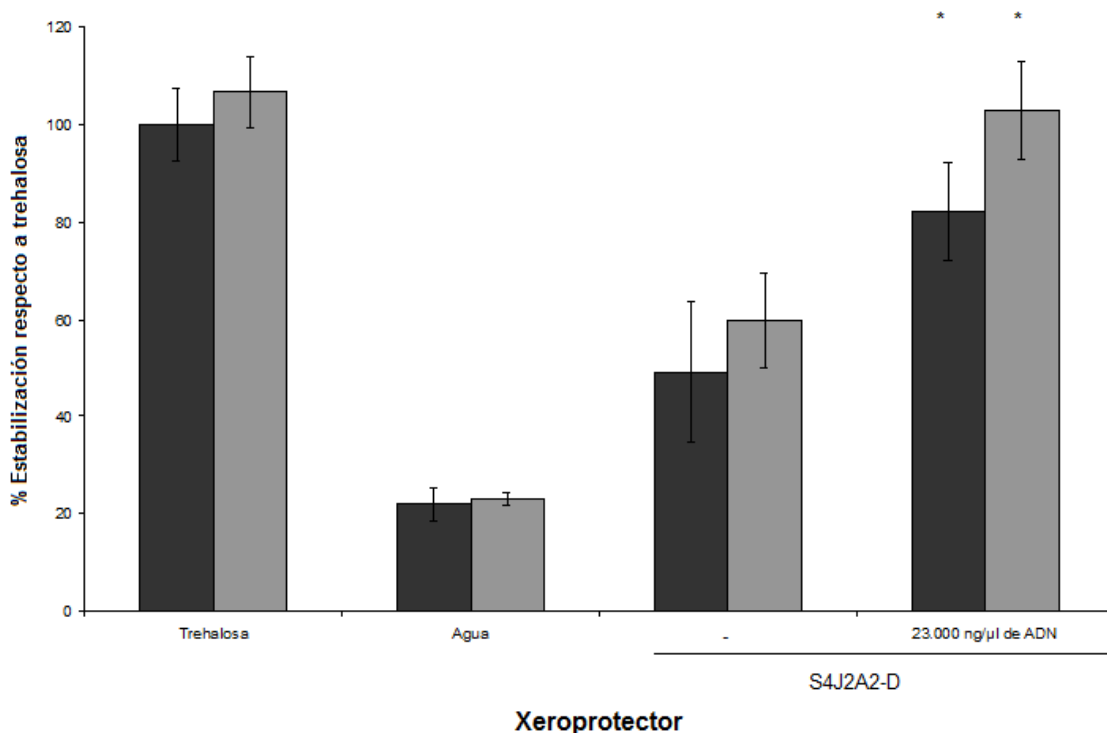


Figura 24 – Ensayo de xeroprotección de lipasa en S4J2A2-D adicionado o no con ADN de pescado. Las barras indican el nivel de actividad de la lipasa tras el proceso de secado al día 1 (negras) y 30 (grises). Se ensayó con una solución del POB S4J2A2-D al 10% (p/v) en presencia y ausencia de ADN de pescado (23.000 ng/µl). Como control positivo se utilizó una solución de trehalosa al 10% (p/v) y como control negativo una solución de agua desionizada. Los ensayos se realizaron por triplicado. Las barras de error indican la desviación típica respecto al valor medio. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a sus controles sin ADN, basado en el cálculo de la *t*-Student.

Con objeto de conocer si las diferencias presentadas eran significativas se realizó un estudio estadístico basado en el cálculo de la *t*-Student. En la figura 24 se observa como la lipasa estabilizada en el xeroprotector S4J2A2-D adicionado con ADN de pescado, presentó un nivel de actividad similar a la solución de trehalosa al 10% (p/v) y significativamente superior al xeroprotector S4J2A2-D sin ADN, según el cálculo de la *t*-Student.

CAPÍTULO 3º

1 - Estudio de la colonización en rábanos por PGPR bacteria pegada a sus semillas por xeroprotectores.

Dado los antecedentes de protección de plantas de tomates y pimientos realizados en nuestro grupo (Vílchez et al., comunicación personal), decidimos probar la capacidad de xeroprotección de otras especies no solanáceas que además pudieran tener posible aplicación en el campo de la biorremediación, así como en la producción de biocombustibles. En concreto se decidió comprobar esta actividad sobre el rábano (*Raphanus sativus*) como ejemplo de la familia de las brassicáceas. Se utilizaron semillas de *Raphanus sativus* porque estas plantas presentan tolerancia significativa a bajas temperaturas, crecimiento rápido, bajos requerimientos agronómicos, bajo coste de cultivo por hectárea y se propone como un cultivo viable para la producción de biodiesel (Kurunczi et al., 2008). Además, las plantas de rábanos se han utilizado en procesos de rizorremediación (Allard et al., 2005; Yi and Crowley, 2007). Con este objetivo nos planteamos tres fases distintas por las que en primer lugar desarrollaremos un estudio para el suministro conjunto de planta y microorganismo, una segunda fase por la que se estudia la protección de la planta frente a la sequía y la promoción del crecimiento de la misma en condiciones de riego. Y una tercera fase en la que se estudia la efectividad del sistema en un ensayo de campo.

Como hemos indicado anteriormente la primera fase de este conjunto de experimentos estaba enfocada a desarrollar una nueva técnica de suministro de bacterias PGPR en plantas. Como referencia se tomó un método previamente desarrollado en nuestro grupo, basado en la estabilización de bacterias en semillas por trehalosa, utilizando poliestireno y cloroformo (Manzanera et al., 2004a). En esta ocasión la trehalosa se sustituyó por el xeroprotector sintético S4J2A2-D descrito en el segundo capítulo de resultados. Este xeroprotector fue elegido por su destacable efecto estabilizador sobre la cepa sensible a desecación de *E. coli* MC4100 y su bajo coste (Narvaez-Reinaldo et al., 2010). Con objeto de establecer una formulación adecuada de semilla y microorganismo, se trató de identificar la eficacia de colonización de la planta utilizando dos formulaciones distintas. Para realizar un correcto seguimiento del proceso de colonización sobre la raíz se obtuvo un mutante doble espontáneo resistente a kanamicina (60615; FLUKA Biochemika) y tetraciclina (87128; SIGMA-Aldrich) de la cepa *Microbacterium* sp 3J1. Para obtener dicho mutante se sembraron 100 µl de un

Resultados – Capítulo 3°

cultivo en TSB saturado en células de la cepa 3J1, sobre placa de TSA con kanamicina a una concentración final de antibiótico de 30 µg/l. Tras incubar durante 72 horas a 30°C, se observó la aparición de 12 colonias y seleccionó una colonia con la que se inocularon 5 ml de TSB en un tubo con una concentración final de kanamicina de 30 µg/l. Este tubo se incubó a 30°C durante 12 horas en agitación y se sembraron 100 µl del cultivo saturado sobre placa de TSA con una concentración final de kanamicina de 30 µg/l y de tetraciclina de 10 µg/l. De nuevo se incubó durante 72 horas a 30°C. Tras esta incubación se observó la aparición de 1 colonia que se seleccionó para su purificación mediante siembra por agotamiento y se denominó 3J1KT. En el siguiente paso se determinó la supervivencia de la cepa mutante al tratamiento con cloroformo, necesario para el proceso de encapsulado en semillas descrito en el apartado 10.2 de *Materiales y métodos*, con objeto de obtener UFC en estado seco y estable. Se inocularon en 30 ml de TSB con una concentración de kanamicina de 30 µg/l y de tetraciclina de 10 µg/l, una colonia de la cepa mutante doble resistente y se incubó durante 12 horas a 30°C y 150 rpm. A continuación se añadieron los 30 ml del cultivo en TSB saturado con las células de la cepa 3J1KT, en 500 ml de TSB, de nuevo con una concentración final de kanamicina de 30 µg/l y de tetraciclina de 10 µg/l, y se volvió a incubar durante 24 horas a 30°C y 150 rpm. Tras el periodo de incubación, los cultivos se alicuotaron en fracciones de 125 ml y se centrifugaron a 13.500 rpm durante 10 minutos. Los precipitados bacterianos se resuspendieron en 10 ml de una solución al 10% (p/v) de trehalosa o del POB sintético S4J2A2-D también al 10% (p/v). Las soluciones se sometieron a un proceso de desecación al vacío durante 48 horas, utilizando un liofilizador (Labconco Freezon 6). Con objeto de conocer si el POB S4J2A2-D protegía a las células tal y como ya se ha descrito para *E. coli* y *P. putida* cuando forman esporas artificiales (Vilchez et al., 2008), se determinó el porcentaje de supervivencia de las muestras desecadas al tratamiento con cloroformo, que consistió en mezclar 9 mg de las muestras desecadas en 100 µl de cloroformo. Se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente y se depositaron sobre placa de vidrio estéril para permitir la retirada del cloroformo por evaporación. Una vez evaporado el cloroformo, la fracción sólida se resuspendió en 1 ml de 1xM9 y se realizaron siembras en TSA, con kanamicina y tetraciclina, por diluciones seriadas. Las placas se incubaron 48 horas a 30°C y el recuento de estas siembras permitió calcular el número de UFC de la cepa mutante por g de líofilo. El proceso de encapsulado de semilla consistió en adherir células de la cepa mutante sobre las semillas de rábanos. Para ello, se disolvió 500 mg de poliestireno en

Resultados – Capítulo 3°

10 ml de cloroformo y 0,124 g con $3,27 \cdot 10^{10}$ UFC de la muestra que contenía la cepa mutante desecada al vacío. A continuación se añadieron 60 semillas a la suspensión y se agitó para asegurar una distribución homogénea. La mezcla se vertió sobre placa petri de vidrio y se incubó a temperatura ambiente hasta evaporación del cloroformo. A continuación se procedió a evaluar la eficacia en la colonización de las semillas por parte de los microorganismos, para ello se utilizaron las semillas con la bacteria estabilizada por xeroprotectores tal y como se describe en el apartado 10.3 de *Materiales y métodos*. Se utilizaron 3 macetas por cada condición a ensayar, cepa encapsulada con trehalosa o S4J2A2-D en las que se sembraron 6 semillas por maceta. Tras la siembra se aplicaron dos riegos semanales de agua destilada estéril de 40 ml por maceta. Tras 32 días desde la siembra, comprobamos la colonización radicular de la cepa mutante desecada tanto en trehalosa como en S4J2A2-D. Para ello, se tomaron raíces y se homogeneizaron en mortero estéril. De este homogeneizado se tomaron 30 mg y se suspendieron en 1 ml de 1xM9. Este estudio se realizó por triplicado. Partiendo de esta suspensión se realizaron por triplicado siembras en placas de TSA con 0,03 mg/l de kanamicina y de tetraciclina. Las placas se incubaron a 30°C durante 48-72 horas y se contaron el número de colonias. La tabla 9 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 9 - Colonización radicular por 3J1KT formulada en semillas con distintos xeroprotectores

Xeroprotector usado	UFC/ml
Trehalosa	$1,73 \cdot 10^7 \pm 6,43 \cdot 10^6$
S4J2A2-D	$1,61 \cdot 10^7 \pm 5,29 \cdot 10^6$

Con estos resultados se realizó un análisis estadístico basado en el cálculo de la *t*-Student, el cual mostró que las diferencias entre los xeroprotectores utilizados no fueron significativas.

2 – Protección contra estrés hídrico por PGPR en rábanos.

Estudios anteriores realizados en nuestro grupo por Vélchez y colaboradores demostraron que la colección de microorganismos hipertolerantes a la desecación aislada, descrita en el capítulo 1 de resultados, presentaban capacidad para proteger cultivos de tomate, pimiento, maíz, soja, puerro y col china frente al estrés hídrico

utilizando una tecnología también previa desarrollada en nuestro grupo para el suministro conjunto de bacterias y semillas.

Con objeto de evaluar si estos efectos eran extensibles a plantas de rábano, decidimos emplear semillas previamente tratadas con y sin inóculos de *Microbacterium* sp 3J1, *Rhodococcus* sp 4J2A2, *Leucobacter* sp 4J7B1, *Arthrobacter* sp 4J27 y *Arthrobacter* sp 5J12A tal y como se ha descrito en el apartado anterior. Estas se sembraron en macetas de polipropileno de 8 x 10 x 7 cm, con una mezcla de vermiculita/sustrato vegetal al 50%, utilizando 6 macetas por cada cepa con 6 semillas cada una. Se realizaron riegos con 40 ml de agua destilada estéril por macetero, dos veces por semana, hasta que las plantas alcanzaron la altura de 4 cm, momento en el cual las macetas se dividieron en dos grupos a uno de los cuales se le continuó regando y al otro en que se cesaron los riegos para simular las condiciones de sequía. La iluminación se basó en ciclos diurnos y nocturnos de 12 horas y la temperatura se mantuvo constante a 26°C. Se tomaron muestras a 7 y 25 días tras el cese de riego, extrayendo los tres mejores especímenes inoculados con *Microbacterium* sp 3J1, *Rhodococcus* sp 4J2A2, *Leucobacter* sp 4J7B1, *Arthrobacter* sp 4J27 y *Arthrobacter* sp 5J12A. Como control positivo se incluyó la rizobacteria con actividad PGPR *P. putida* KT2440 (Leveau and Lindow, 2005; Nelson et al., 2002) y como control negativo se utilizaron semillas de plantas tratadas en las mismas condiciones pero sin bacteria.

En cada punto de muestreo, se calcularon diferentes parámetros incluyendo: peso fresco (PF), peso seco (PS), peso totalmente túrgido (PTT), contenido relativo de agua (CRA), potencial de agua recuperada (PRA), índice retenido de agua (IRA), longitud radicular y longitud del tallo, como se describieron en la sección de 10.4 *Materiales y métodos*.

Como se muestra en la figura 25, a los 7 días en ausencia de riego las plantas inoculadas presentaron mayores niveles de PF que las plantas no inoculadas (controles negativos). Solo las plantas inoculadas con 3J1, 4J27 y 5J12A presentaron valores significativamente superiores a las inoculadas con *P. putida* KT2440, mientras que las inoculadas con 4J2A2 y 4J7B1 no mostraron diferencias significativas con la cepa de *Pseudomonas*.

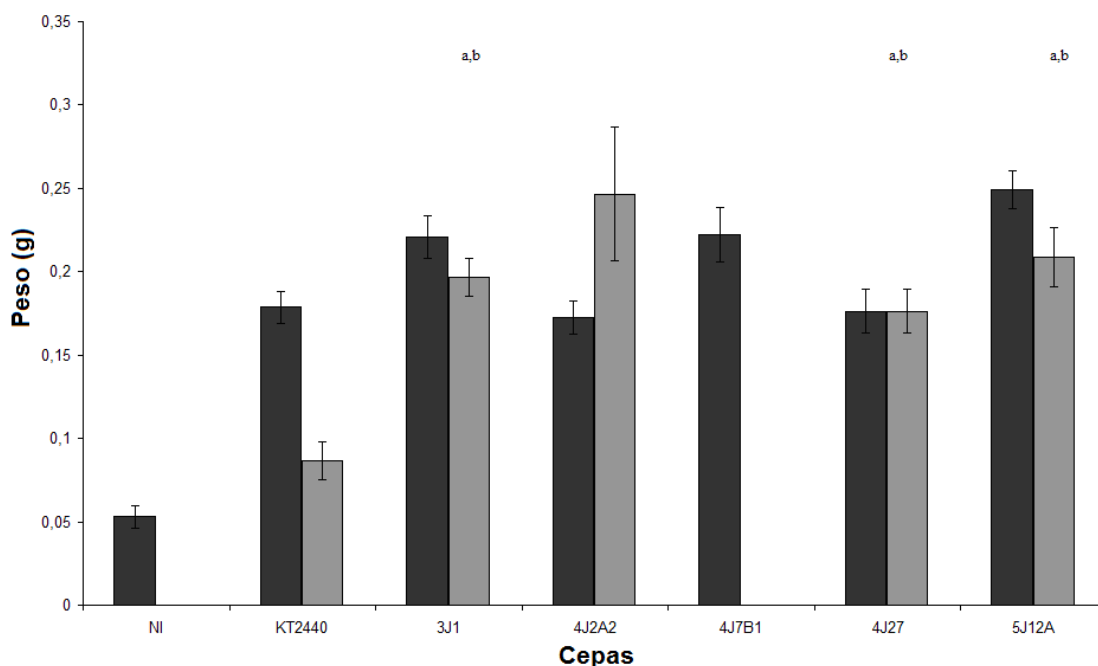


Figura 25 – Peso Fresco (PF) de las plantas de rábanos inoculadas con las cepas aisladas bajo condiciones de sequía. El eje de ordenadas muestra el peso en gramos. El eje de abscisas indica el inóculo utilizado. Las barras negras corresponden a muestras registradas en el día 7 y las grises el día 25. Los controles negativos fueron plantas no inoculadas (NI) y como control positivo se utilizaron plantas inoculadas con *P.putida* KT2440. La media se basó en los tres mejores especímenes de cada caso. Las letras muestran diferencias significativas, tras 25 días, respecto al control negativo (a) y al control positivo (b), basado en el análisis de la varianza.

De las muestras tomadas tras 25 días sin riego, solo las plantas inoculadas con *Rhodococcus* sp 4J2A2 mostraron un PF mayor que en el punto de muestreo previo. Así, las plantas inoculadas con *Leucobacter* sp 4J7B1 y las plantas no inoculadas presentaban una apariencia completamente marchita. Por otra parte, el resto de plantas inoculadas mostraron valores similares entre ellas, con valores de más del doble del observado en plantas inoculadas con el control positivo de *P. putida* KT2440. Un análisis estadístico basado en el cálculo de la *t*-Student, mostró que las diferencias fueron significativas para las plantas inoculadas con *Microbacterium* sp 3J1, *Arthrobacter* sp 4J27 y *Arthrobacter* sp 5J12A respecto a las plantas inoculadas con el control positivo y plantas sin inocular (control negativo), tras 25 días en ausencia de riegos.

De forma similar se estimó el Peso Seco (PS) de las plantas tras 7 y 25 días después del cese de riego. El PS de las diferentes plantas fue mucho menor que el PF, con valores siempre por debajo de 0,02 gr. Como se muestra en la figura 26, tras 7 días en ausencia

Resultados – Capítulo 3º

de riegos todas las plantas mostraron un PS próximo a 0,008 g. Tras 25 días los PS de las diferentes plantas inoculadas no varió en todas las condiciones respecto al punto de muestreo previo, excepto para las plantas no inoculadas y plantas inoculadas con *Leucobacter* sp 4J7B1 que se encontraban marchitas. Se realizó un tratamiento estadístico basado en el análisis de la varianza que evidenció que las plantas inoculadas con *Microbacterium* sp 3J1 presentaron diferencias significativas respecto al control negativo tras 25 días en ausencia de riegos.

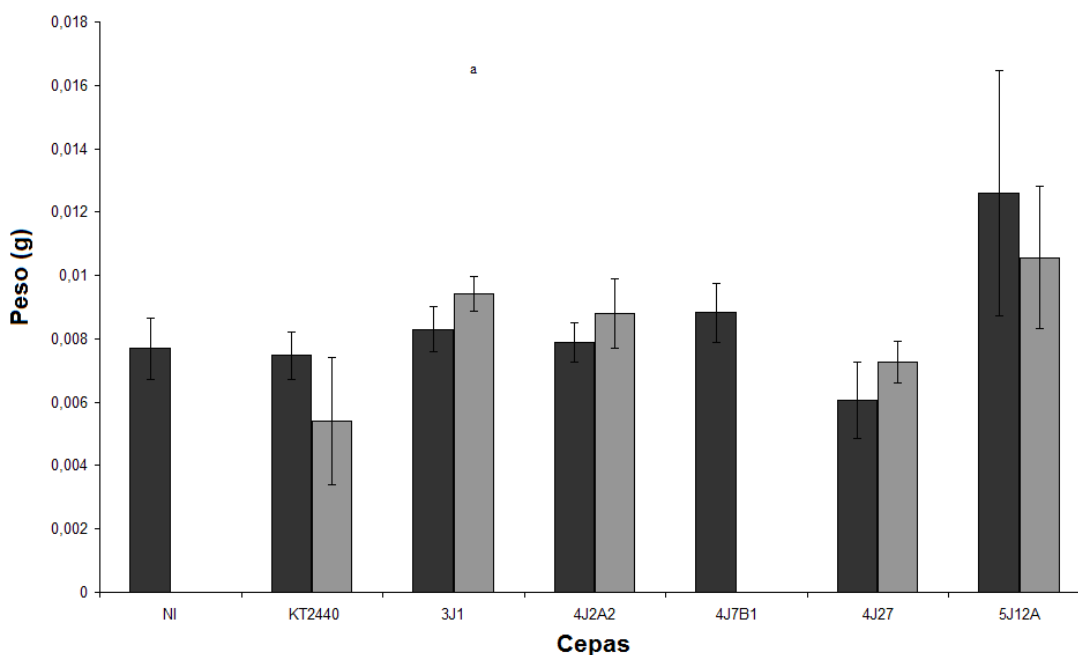


Figura 23 – Peso Seco (PS) de las plantas de rábanos inoculadas con las cepas aisladas bajo condiciones de sequía. El eje de ordenadas muestra el peso en gramos. El eje de abscisas indica el inóculo utilizado. Las barras negras corresponden a muestras registradas en el día 7 y las grises el día 25. Los controles negativos fueron plantas no inoculadas (NI) y como control positivos plantas inoculadas con *P.putida* KT2440. La media se baso en los tres mejores especímenes de cada caso. La letra a muestra diferencias significativas, tras 25 días en ausencia de riegos, respecto al control negativo .

También se estudió el valor del Peso Totalmente Túrgido (PTT) en plantas tras 7 y 25 días en ausencia de riego. Como se muestra en la figura 24, los valores de PTT de las plantas inoculadas siguieron un patrón similar a los valores de PF pero con unidades mayores. Como hemos indicado anteriormente las plantas no inoculadas o inoculadas con *Leucobacter* sp 4J7B1 se encontraban completamente marchitas, por lo que no se muestra su valor. En el punto de muestreo correspondiente al día 25, presentaron diferencias estadísticamente significativas basadas en el análisis de la varianza, entre el control negativo y las plantas inoculadas con *Microbacterium* sp 3J1, *Artrhobacter* sp 4J27 y *Artrhobacrer* sp 5J12A. Todas ellas presentaron un valor de más del doble de las

plantas inoculadas con el control positivo y sus valores de PTT fueron similares entre ellas en este punto de muestreo. Sin embargo, debido a la amplitud de las barras de error solo las plantas inoculadas con *Artrhobacter* sp 5J12A presentaron valores significativamente superiores a aquellos inoculados con *P. putida* KT2440 (control positivo).

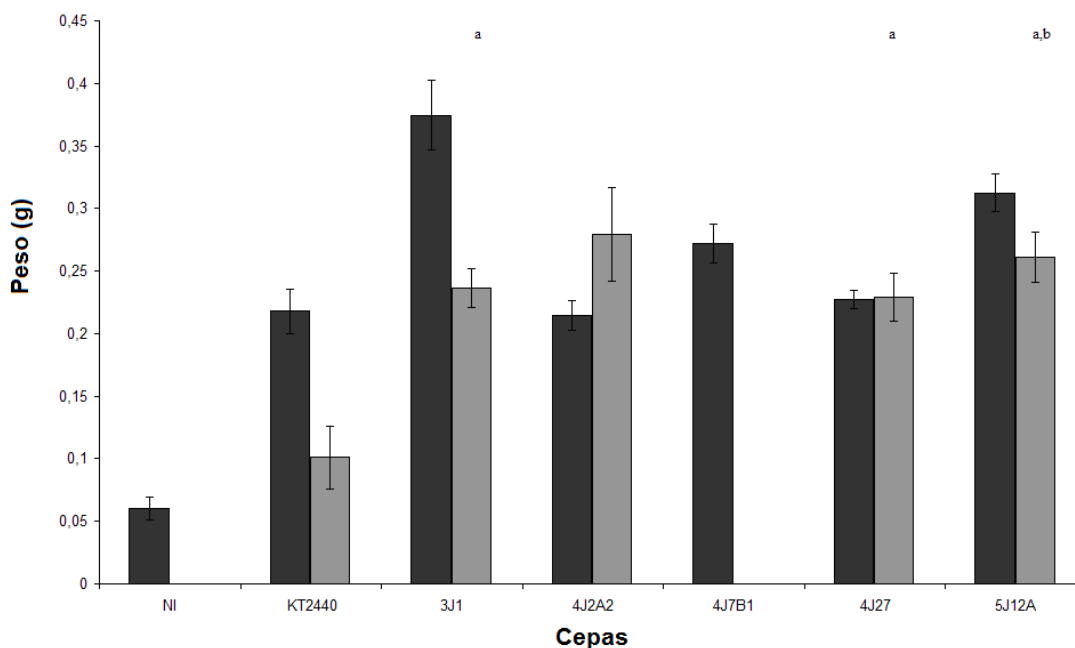


Figura 27 – Peso Totalmente Túrgido (PTT) de las plantas de rábanos inoculadas con las cepas aisladas bajo condiciones de sequía. El eje de ordenadas muestra el peso en gramos. El eje de abscisas indica el inóculo utilizado. Las barras negras corresponden a muestras registradas en el día 7 y las grises el día 25. Los controles negativos fueron plantas no inoculadas (NI) y como control positivo se utilizaron plantas inoculadas con *P.putida* KT2440. La media se baso en los tres mejores especímenes de cada caso. Las letras muestran diferencias significativas, tras 25 días, respecto al control negativo (a) y al control positivo (b), basado en el análisis de la varianza.

A partir de los parámetros anteriores se definió el Potencial de Recuperación de Agua (PRA), como la diferencia entre el PTT y el PF. Este índice permite conocer si las estructuras celulares han sufrido algún tipo de daño como consecuencia del estrés hídrico, que afecte a su capacidad potencial para recuperar agua. Como se muestra en la figura 28 los valores de PRA de las plantas inoculadas con las cepas en estudio, presentaron valores superiores al control negativo tras 7 días en ausencia de riegos. Además todas las plantas inoculadas mostraron valores similares entre si en el primer punto de muestreo, a excepción de aquellas inoculadas con *Microbacterium* sp 3J1 que mostraron un valor del PRA cuatro veces superior al resto de plantas inoculadas. Tras 25 días en ausencia de riegos, se observó un descenso del valor del PRA en las plantas inoculadas con *Microbacterium* sp 3J1, *P. putida* KT2440, *Leucobacter* sp 4J7B1 y

Resultados – Capítulo 3°

plantas sin inocular. Sin embargo un análisis de la varianza no mostró diferencias estadísticamente significativas del PRA, entre las plantas inoculadas con las bacterias xerotolerantes aisladas y los controles con *P. putida* KT2440 tras 25 días en ausencia de riego.

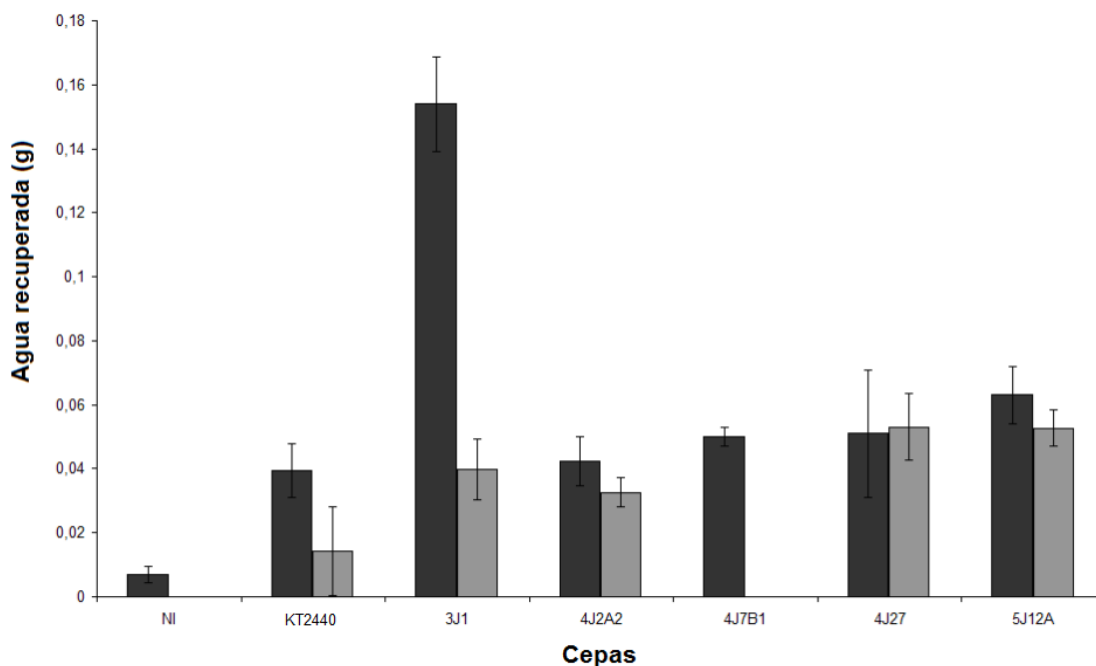


Figura 25 – Potencial de Recuperación del Agua (PRA) de las plantas de rábanos inoculadas con las cepas aisladas bajo condiciones de sequía. El eje de ordenadas muestra el peso en gramos de agua recuperada. El eje de abscisas indica el inóculo utilizado. Las barras negras corresponden a muestras registradas en el día 7 y las grises el día 25. Los controles negativos fueron plantas no inoculadas (NI) y como control positivos plantas inoculadas con *P.putida* KT2440. La media se basó en los tres mejores especímenes de cada caso.

Los valores de CRA describen la cantidad de agua inmovilizada en las estructuras celulares de la planta frente a su potencial teórico de retención. En la figura 29 se observa que tras 7 días en ausencia de riegos, las plantas de todas las condiciones estudiadas presentaron valores próximos a 0,8; exceptuando las inoculadas con *Microbacterium* sp 3J1 que muestran un valor de CRA igual a 0,6. Una vez alcanzados los 25 días en ausencia de riego, se observa que las plantas no inoculadas e inoculadas con *Leucobacter* sp 4J7B1 perdieron totalmente su contenido relativo de agua, mientras que aquellas inoculadas con *Microbacterium* sp 3J1 mostraron un incremento de su CRA del 25% respecto al punto de muestreo previo, igualando los resultados alcanzados por las plantas inoculadas con el resto de cepas ensayadas que mantuvieron sus valores de CRA entre ambos puntos de muestreo. Un análisis de la varianza mostró diferencias significativas entre las plantas inoculadas con *Microbacterium* sp 3J1, *Rhodococcus* sp

4J2A2, *Artrhobacter* sp 4J27 y *Artrhobacter* sp 5J12A respecto a las plantas no inoculadas tras 25 días sin riego.

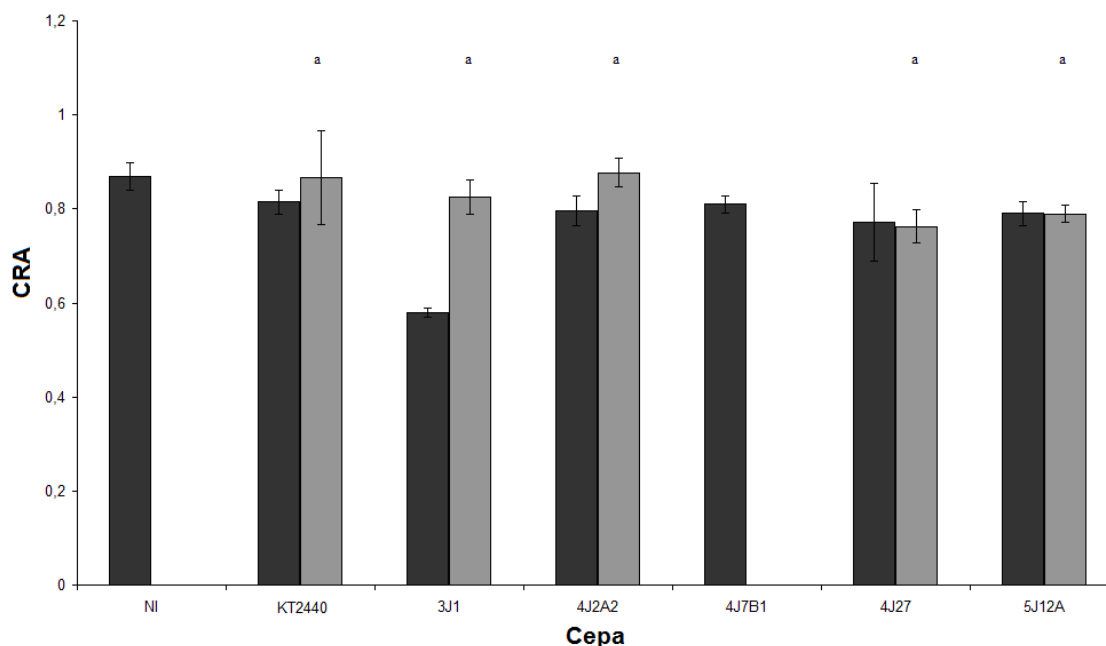


Figura 29 – Contenido Relativo de Agua (CRA) de plantas de rábanos inoculadas con las cepas aisladas bajo condiciones de sequía. El eje de ordenadas muestra valores adimensionales de CRA. El eje de abscisas indica el inóculo utilizado. Las barras negras corresponden al día 7 y las grises al día 25. Como control negativo se utilizaron plantas no inoculadas (NI) y como control positivo plantas inoculadas con *P.putida* KT2440. La media se basó en los tres mejores especímenes de cada caso. Las letras muestran diferencias significativas, tras 25 días en ausencia de riegos, respecto al control negativo (a), basado en el análisis de la varianza.

Los valores del IRA reflejan la cantidad de agua presente en la planta. En la figura 30 se observa que tras 7 días en ausencia de riegos las plantas no inoculadas presentaron menor cantidad de agua que el resto de plantas inoculadas, que mostraron un volumen de agua retenida que osciló desde los 0,15 g para las plantas con *P. putida* KT2440, *Rhodococcus* sp 4J2A2 y *Arthrobacter* sp 4J27; hasta 0,20 g para las plantas con *Microbacterium* sp 3J1, *Leucobacter* sp 4J7B1 y *Arthrobacter* sp 5J12A. Al alcanzar los 25 días en ausencia de riegos, las plantas no inoculadas e inoculadas con *Leucobacter* sp 4J7B1 perdieron toda el agua retenida en sus estructuras celulares, mientras que las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 perdieron el 50% de su volumen de agua. Las plantas con *Microbacterium* sp 3J1 y *Arthrobacter* sp 4J27 conservaron el volumen de agua respecto al punto de muestreo previo, mientras que se produjo un suave incremento para plantas inoculadas con *Rhodococcus* sp 4J2A2. Por otro lado, las plantas inoculadas con *Artrhobacter* sp 5J12A mostraron un suave descenso del contenido de agua respecto al anterior punto de muestreo. Un análisis

Resultados – Capítulo 3°

estadístico de los datos basado en el análisis de la varianza, mostró diferencias significativas entre las plantas inoculadas con *Microbacterium* sp 3J1, *Arthrobacter* sp 4J27 y *Arthrobacter* sp 5J12A respecto al control negativo y positivo tras 25 días sin riego.

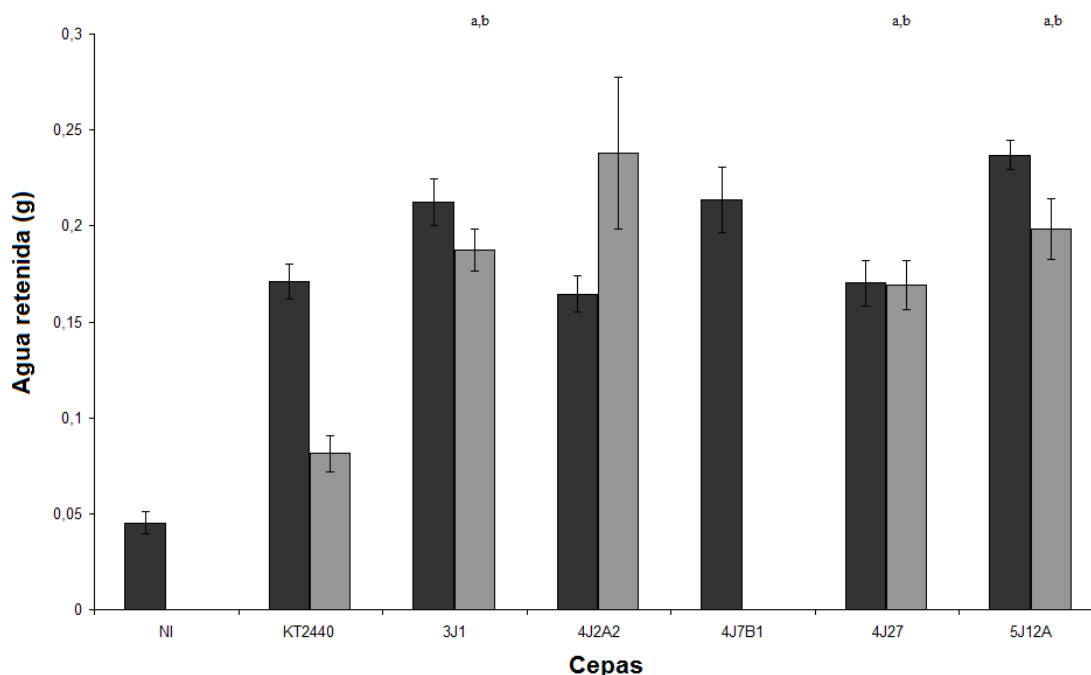


Figura 30 – Índice de Retención de Agua (IRA) de las plantas de rábanos inoculadas con las cepas aisladas bajo condiciones de sequía. El eje de ordenadas muestra valores de agua retenida en g. El eje de abscisas indica el inóculo utilizado. Las barras negras corresponden al día 7 y las grises al día 25. Como control negativo se utilizaron plantas no inoculadas (NI) y como control positivo plantas inoculadas con *P.putida* KT2440. La media se basó en los tres mejores especímenes de cada caso. Las letras muestran diferencias significativas, tras 25 días en ausencia de riegos, respecto al control negativo (a) y al control positivo (b), basado en el análisis de la varianza.

Además del peso de las plantas se registró la longitud alcanzada por las mismas, tanto de su parte aérea (tallo) como de su parte subterránea (raíz) para todas las plantas inoculadas tras 7 y 25 días en ausencia de riegos. Como se muestra en la figura 31, todas las plantas presentaron valores de longitud del tallo similares (aproximadamente 12 cm), independientemente del inoculante utilizado, tras 7 días en ausencia de riego. Estos valores se repitieron tras 25 días en ausencia de riego para todos los casos, excepto para las plantas con *Arthrobacter* sp 4J27 que mostraron un leve descenso, así como para las plantas con *Leucobacter* sp 4J7B1 y plantas sin inocular que se marchitaron. Un tratamiento estadístico basado en el análisis de la varianza evidenció que solo las plantas con *Microbacterium* sp 3J1 presentó una longitud de las raíces significativamente superior a las plantas sin inóculo, tras 25 días en ausencia de agua.

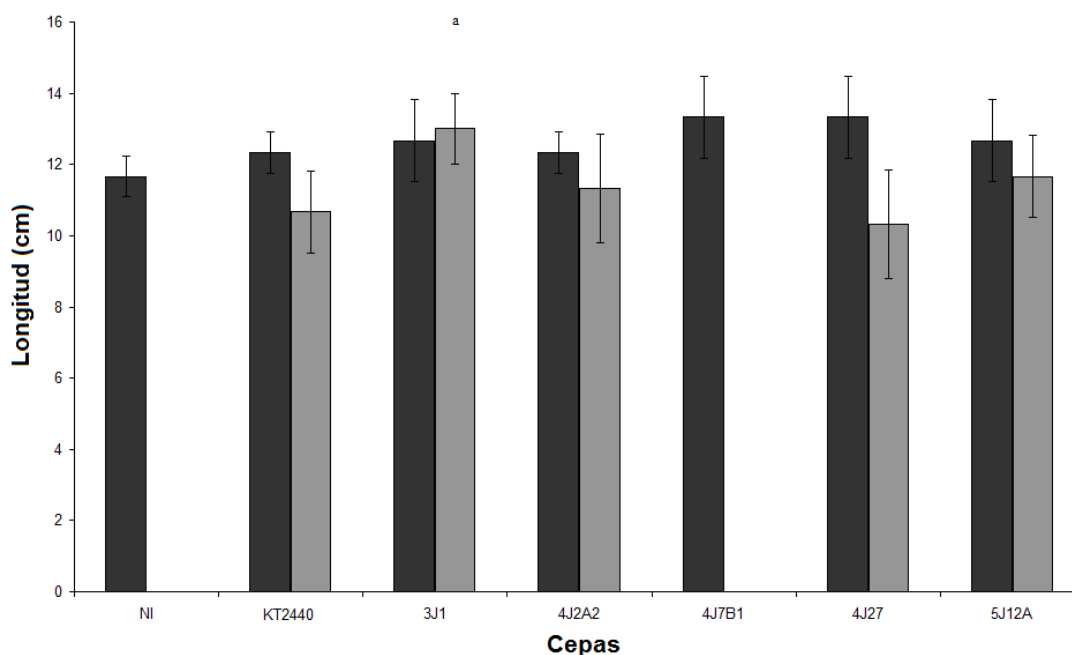


Figura 28 – Longitud del tallo de las plantas de rábanos inoculadas con las cepas aisladas bajo condiciones de sequía. El eje de ordenadas muestra la longitud en cm. El eje de abscisas indica el inóculo utilizado. Las barras negras corresponden al día 7 y las grises al día 25. Como control negativo se utilizaron plantas no inoculadas (NI) y como control positivo plantas inoculadas con *P.putida* KT2440. La media se basó en los tres mejores especímenes de cada caso. La letra a señala diferencias significativas respecto al control negativo tras 25 días en ausencia de agua, basado en el análisis de la varianza.

También estudiamos la evolución de la longitud radicular en ausencia de riego desde el inicio del experimento, como se muestra en la figura 32. Tras 7 días en ausencia de agua todas las plantas presentaron valores similares de la longitud de sus raíces, que oscilaron entre los 2 y 5 cm, independientemente del inoculante aplicado. Tras 25 días desde el inicio del ensayo los valores de longitud radicular se mantuvieron en todos los casos, excepto para las plantas con *Leucobacter* sp 4J7B1 y sin inocular que se encontraron marchitas. Además un tratamiento estadístico basado en el análisis de la varianza no evidenció diferencias significativas entre ningún caso.

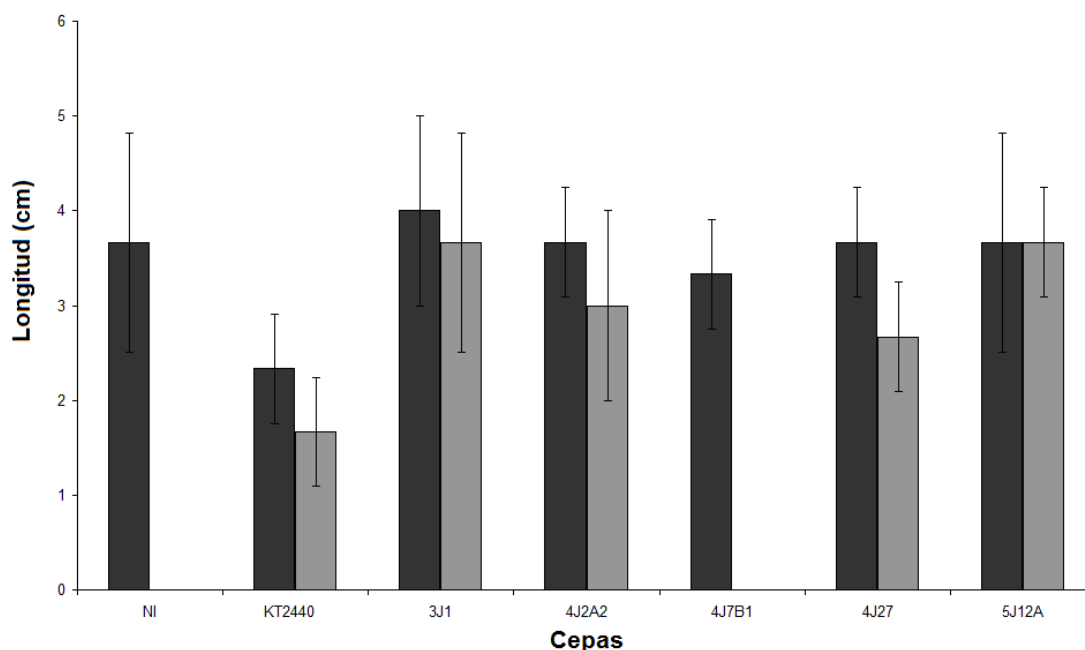


Figura 32 – Longitud de raíces de las plantas de rábanos inoculadas con las cepas aisladas bajo condiciones de sequía. El eje de ordenadas muestra la longitud en cm. El eje de abscisas indica el inóculo utilizado. Las barras negras corresponden al día 7 y las grises al día 25. Como control negativo se utilizaron plantas no inoculadas (NI) y como control positivo plantas inoculadas con *P.putida* KT2440. La media se basó en los tres mejores especímenes de cada caso.

3 – Promoción del crecimiento de rábanos por los aislados xerotolerantes en condiciones de riego.

Basado en los resultados obtenidos para el tamaño de las plantas bajo las condiciones de estrés hídrico en la sección previa, decidimos estudiar la capacidad de las bacterias aisladas para promover el crecimiento de los rábanos bajo irrigación. Con este objetivo, decidimos realizar un nuevo ensayo bajo condiciones de riego para verificar esa capacidad. La metodología utilizada fue la misma que la descrita en la sección previa pero la irrigación se mantuvo de forma periódica añadiendo 40 ml de agua destilada estéril cada 48-72 horas, durante todo el ensayo. Los puntos de muestreo se registraron tras 7 y 25 días desde que las plántulas alcanzaron una altura de 4 cm. Por cada punto de muestreo, se tomaron los 3 mejores especímenes de las plantas inoculadas con *Microbacterium* sp 3J1, *Rhodococcus* sp 4J2A2, *Leucobacter* sp 4J7B1, *Arthrobacter* sp 4J27 y *Arthrobacter* sp 5J12A. Como control positivo se utilizaron plantas inoculadas con *P.putida* KT2440 y como control negativo plantas no inoculadas. De nuevo los parámetros medidos fueron PF, PS, PTT, CRA, PRA, IRA, longitud radicular y longitud del tallo, descritas en la sección de *Materiales y métodos*.

Como se muestra en la figura 33, los valores de PF de todas las plantas inoculadas fueron similares para ambos puntos de muestreo. Sin embargo, las plantas inoculadas con *Microbacterium* sp 3J1 mostraron un incremento alrededor del 20% tras 25 días respecto al punto de muestreo previo. El análisis de la varianza no mostró diferencias significativas entre las plantas inoculadas con las bacterias aisladas y los controles.

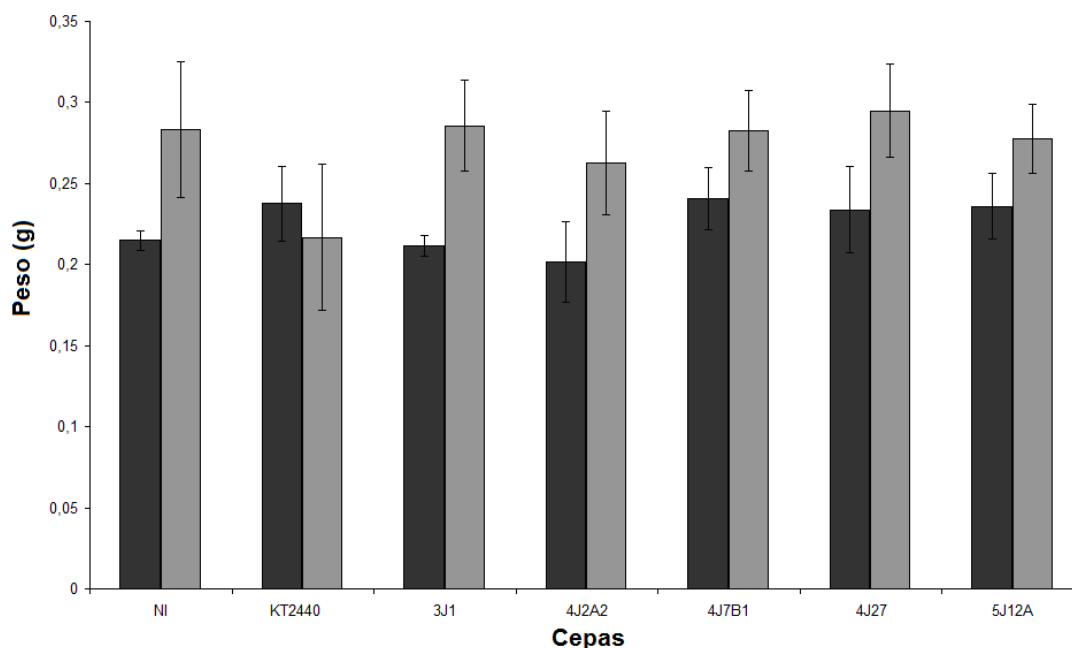


Figura 33 – Peso Fresco (PF) de plantas de rábanos inoculadas con las cepas aisladas bajo condiciones de riego. El eje de ordenadas muestra el peso en g. El eje de abscisas indica el inóculo utilizado. Las barras negras corresponden a muestras registradas en el día 7 y las grises el día 25. Los controles negativos fueron plantas no inoculadas (NI) y como control positivos plantas inoculadas con *P. putida* KT2440. La media se basó en los tres mejores especímenes de cada caso.

De forma similar el PS de las plantas fue medido tras 7 y 25 días respecto del inicio del experimento. El PS en todos los casos fue mucho menor que el PF, con valores siempre menores a 0,018 g. Como se muestra en la figura 34, el PS de las diferentes plantas inoculadas tras 7 días de riego fue similar en todos los casos, así como con los valores presentados por el control en ausencia de inóculo y por el control positivo de *P. putida* KT2440. Tras 25 días del ensayo, los valores de PS de todas las plantas fueron similares al punto de muestreo previo, excepto para las inoculadas con *Arthrobacter* sp 4J27 que presentaron un incremento de alrededor del 50% respecto al punto de muestreo previo. Ninguna de las plantas inoculadas bajo estudio mostró diferencias significativas, basado en el análisis de la varianza, respecto a las plantas control.

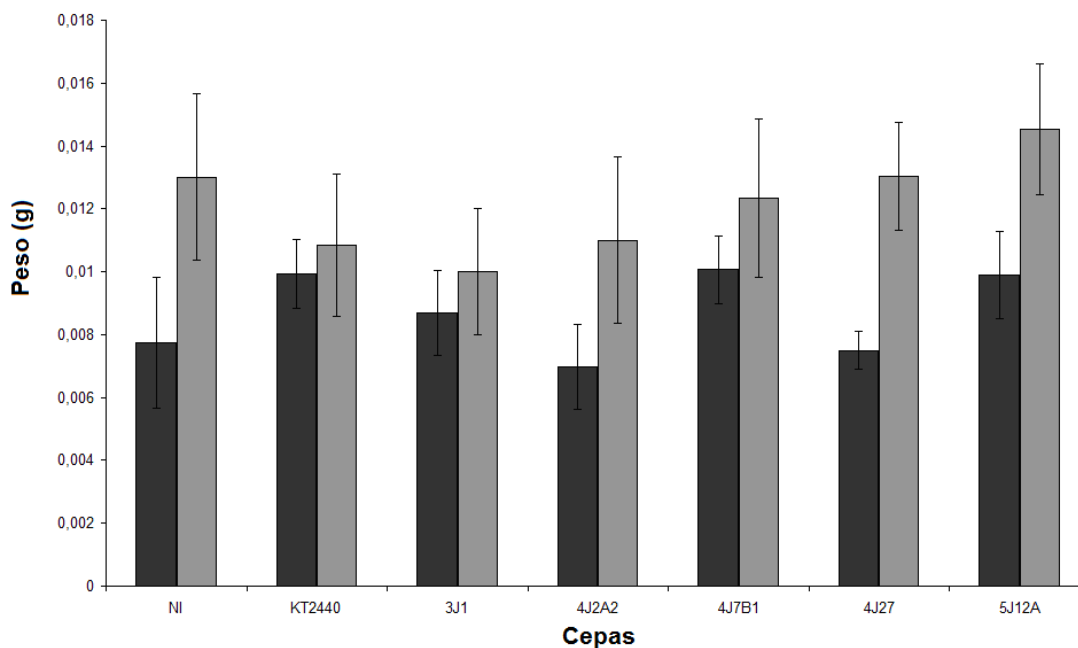


Figura 34 – Peso Seco (PS) de las raíces de las plantas de rábanos inoculadas con las cepas aisladas bajo condiciones de riego. El eje de ordenadas muestra el peso en g. El eje de abscisas indica el inóculo utilizado. Las barras negras corresponden a muestras registradas en el día 7 y las grises el día 25. Los controles negativos fueron plantas no inoculadas (NI) y como control positivos plantas inoculadas con *P.putida* KT2440. La media se baso en los tres mejores especímenes de cada caso.

También estudiamos los valores para el PTT. Como se muestra en la figura 35, el PTT de las plantas inoculadas siguió un patrón similar al del PF pero con valores superiores. Así, tras 7 días de ensayo todas las plantas presentaron un peso similar entre si. Tras 25 días los valores fueron también similares al punto de muestreo previo. Así, el análisis de la varianza no mostró diferencias significativas entre los controles y el resto de los casos estudiados.

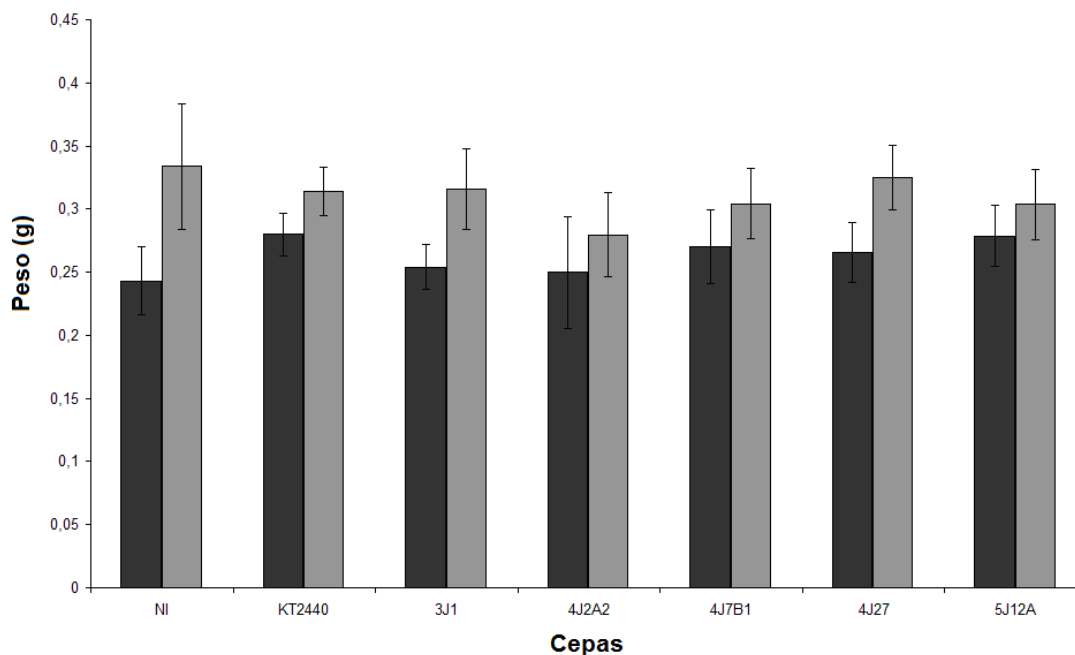


Figura 35 – Peso Totalmente Túrgido (PTT) de raíces de plantas de rábanos inoculadas con las cepas aisladas bajo condiciones de riego. El eje de ordenadas muestra el peso en g. El eje de abscisas indica el inóculo utilizado. Las barras negras corresponden a muestras registradas en el día 7 y las grises el día 25. Los controles negativos fueron plantas no inoculadas (NI) y como control positivos plantas inoculadas con *P.putida* KT2440. La media se baso en los tres mejores especímenes de cada caso.

La figura 36 muestra valores de PRA. Para todos los casos se registraron valores similares tras 7 y 25 días respecto al inicio del ensayo, excepto para las plantas inoculadas con *P.putida* KT2440 que a pesar de la gran desviación típica presentada mostraron un incremento alrededor del 50% respecto al punto de muestreo previo. Las plantas inoculadas con *Rhodococcus* sp 4J2A2 también se mostraron como una excepción pero en este caso se redujo un 50%, también a pesar de la gran desviación típica para el valor medio del primer punto de muestreo. Sin embargo, tras aplicar un estudio estadístico basado en el análisis de la varianza, a pesar de observar estas diferencias, en ningún caso fueron significativas.

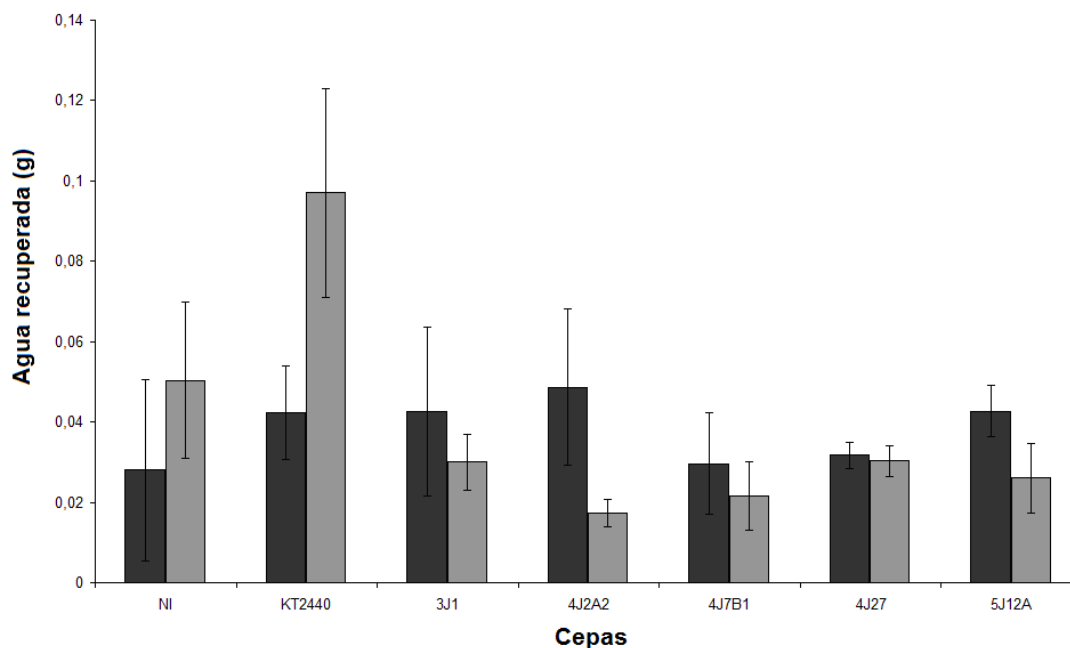


Figura 36 – Potencial de Recuperación de Agua (PRA) de plantas de rábanos inoculadas con las cepas aisladas bajo condiciones de riego. El eje de ordenadas muestra el peso en gramos de agua recuperada. El eje de abscisas indica el inóculo utilizado. Las barras negras corresponden a muestras registradas en el día 7 y las grises el día 25. Los controles negativos fueron plantas no inoculadas (NI) y como control positivos plantas inoculadas con *P.putida* KT2440. La media se baso en los tres mejores especímenes de cada caso.

La figura 37 muestra los resultados obtenidos de CRA en este ensayo. Así, al séptimo día del experimento todas las plantas presentaron un valor de CRA similar, próximo a 0,8 g de agua recuperada. Al día 25 las plantas presentaron valores similares respecto al punto de muestreo previo, aunque las inoculadas con *Rhodococcus* sp 4J2A2 y *Artrhobacter* sp 5J12A presentaron valores de CRA superiores en torno al 11%. Se realizó un tratamiento estadístico basado en el análisis de la varianza de los datos, para encontrar diferencias significativas de las plantas inoculadas con las bacterias aisladas respecto a los controles utilizados. El resultado de este análisis descarto esas diferencias.

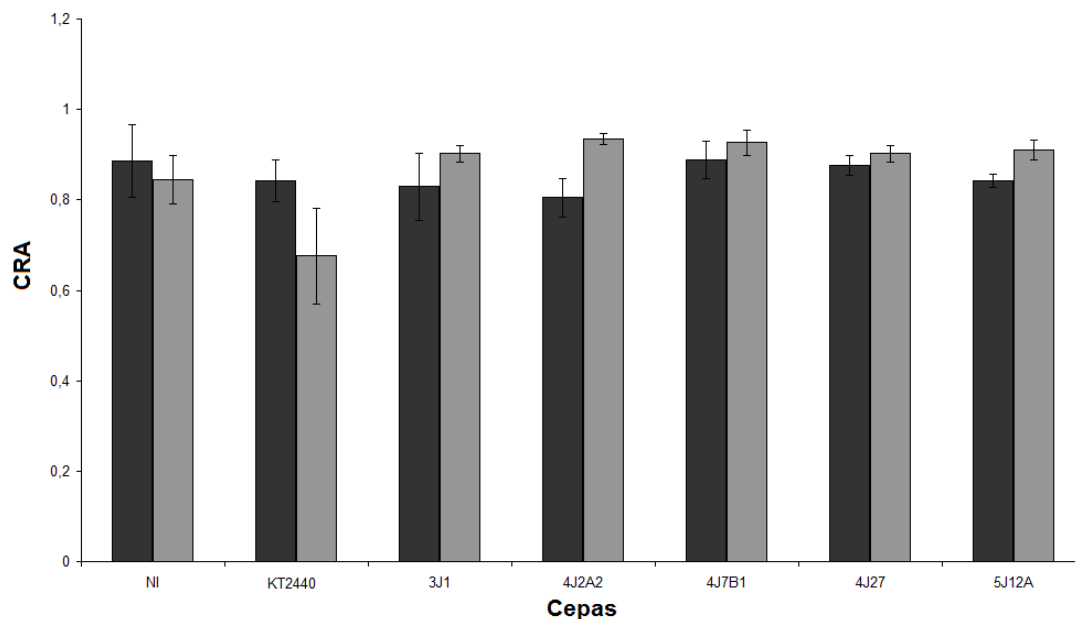


Figura 37 – Contenido Relativo de Agua (CRA) de plantas de rábanos inoculadas con las cepas aisladas bajo condiciones de riego. El eje de ordenadas muestra valores adimensionales de CRA. El eje de abscisas indica el inóculo utilizado. Las barras negras corresponden al día 7 y las grises al día 25. Como control negativo se utilizaron plantas no inoculadas (NI) y como control positivo plantas inoculadas con *P.putida* KT2440. La media se basó en los tres mejores especímenes de cada caso.

La figura 38 muestra los valores del IRA. Transcurridos 7 días desde que las plantas alcanzaron una altura de 4 cm, momento en el que comenzó el experimento, todos los casos presentaron valores próximos a 0,2 y 0,25 g de agua retenida. En el siguiente punto de muestreo todos los casos presentaron valores del IRA similares a los registrados en el anterior punto de muestreo, excepto para las plantas inoculadas con *Microbacterium* sp 3J1 que presentaron un incremento aproximado del 20%. Sin embargo el análisis de la varianza no mostró diferencias significativas entre los controles y el resto de casos estudiados.

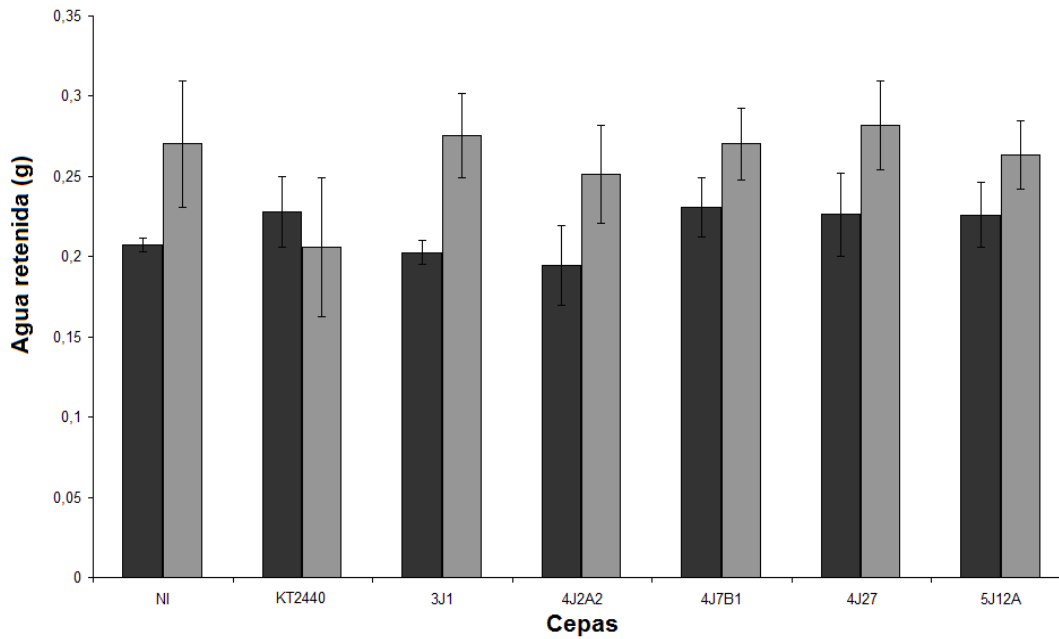


Figura 38 – Índice de Retención de Agua de plantas de rábanos inoculadas con las cepas aisladas bajo condiciones de riego. El eje de ordenadas muestra el peso en gramos de agua recuperada. El eje de abscisas indica el inóculo utilizado. Las barras negras corresponden a muestras registradas en el día 7 y las grises el día 25. Los controles negativos fueron plantas no inoculadas (NI) y como control positivos plantas inoculadas con *P.putida* KT2440. La media se baso en los tres mejores especímenes de cada caso.

Como se muestra en la figura 39, las alturas registradas por las plantas inoculadas fueron similares en todos los casos independientemente del inóculo empleado o del tiempo de muestreo. Un tratamiento estadístico basado en el análisis de la varianza mostró incrementos no significativos en todos los casos entre los dos puntos de muestreos.

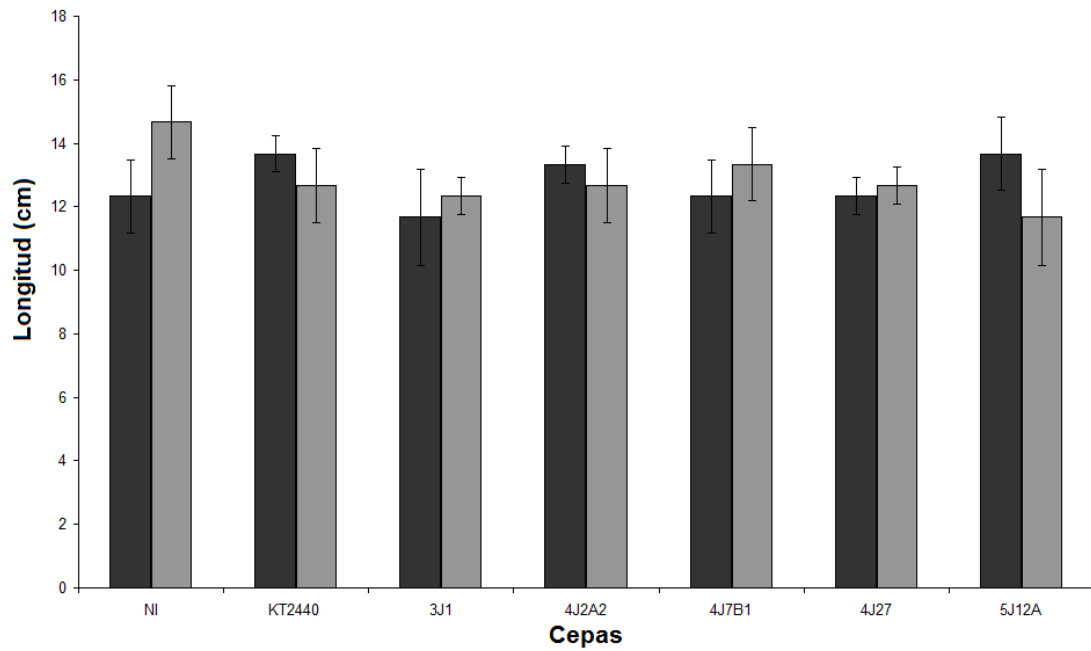


Figura 39 – Longitud del tallo de plantas de rábanos inoculadas con las cepas aisladas bajo condiciones de riego. El eje de ordenadas muestra la longitud en cm. El eje de abscisas indica el inóculo utilizado. Las barras negras corresponden al día 7 y las grises al día 25. Como control negativo se utilizaron plantas no inoculadas (NI) y como control positivo plantas inoculadas con *P.putida* KT2440. La media se basó en los tres mejores especímenes de cada caso.

Los datos sobre longitud radicular se muestran en la figura 39. En los dos puntos de muestreo se registraron idénticos valores de longitud de raíces para todas las plantas en estudio, independientemente del inoculante utilizado, que oscilaron entre 2 y 5 cm. De nuevo se aplicó a los datos registrados un tratamiento estadístico basado en el análisis de la varianza, que confirmó la ausencia de diferencias significativas entre los distintos casos estudiados.

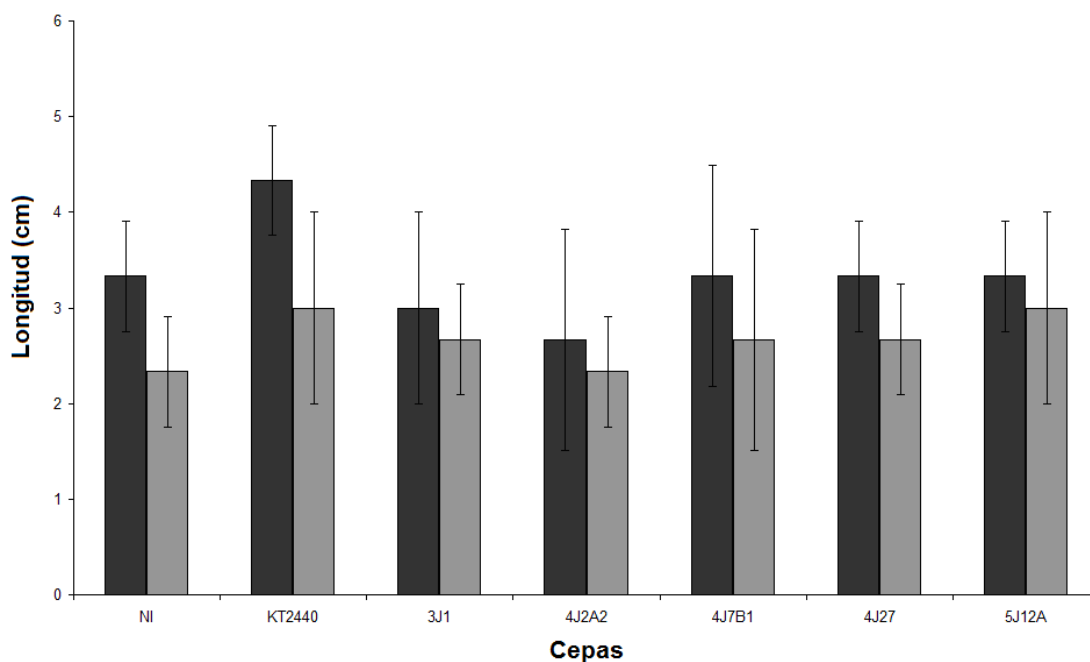


Figura 40 – Longitud de raíces de las plantas de rábanos inoculadas con las cepas aisladas bajo condiciones de riego. El eje de ordenadas muestra la longitud en cm. El eje de abscisas indica el inóculo utilizado. Las barras negras corresponden al día 7 y las grises al día 25. Como control negativo se utilizaron plantas no inoculadas (NI) y como control positivo plantas inoculadas con *P.putida* KT2440. La media se basó en los tres mejores especímenes de cada caso.

4 – Protección de cultivos de rábanos frente al estrés hídrico por bacteria PGPR pegada a sus semillas.

Tras estudiar y confirmar la colonización radicular de las cepas aisladas encapsuladas en las semillas por los xeroprotectores una vez producida la germinación, se procedió a verificar su potencial uso a escala de campo.

Los ensayos se realizaron en un huerto localizado en la Vega de Granada (37.101 latitud N y 3.365 latitud O). La composición litológica del territorio presentó depósitos aluviales calcáreos, con un piso geomorfológico y un relieve suave. El suelo de la Vega de Granada presenta una textura rica en limos (57%), arenas (20%) y arcillas (22%). Entre las características físico-químicas se ha descrito un pH próximo a 8, con una conductividad (ms/cm a 25°C) de entre 3 y 3,5; así como un porcentaje de materia orgánica del 1,81%, del carbono orgánico del 1,05% y del nitrógeno total del 0,07% (Mabrouki et al., 2001). Este ambiente se encuentra bajo la influencia de un microclima mediterráneo continental con un verano seco (Granada, 2001).

Resultados – Capítulo 3°

Se decidió realizar cultivos de rábanos en ausencia de riego. Solo se regó durante el primer mes para facilitar la germinación, una vez por semana y por inundación. Tras este período, no se realizó ningún tipo de riego. La siembra se realizó el 1 de junio de 2011 y el punto de muestreo se tomó el 28 de julio de 2011, mientras que se cesó el riego el 30 de junio del mismo año. Durante ese periodo no se registraron lluvias. Durante la fase de riegos se aseguró una humedad constante en el huerto del 60%, descendiendo hasta el 32,6% en el momento de realizar el muestreo tras 28 días en ausencia de riegos.

Nuevamente los parámetros estudiados fueron los anteriormente analizados a escala de laboratorio. Como parámetros directos se tomaron PF, PTT, PS, la longitud radicular y la longitud del tallo. Otros parámetros indirectos tomados fueron CRA, PRA y el IRA. El punto de muestreo se tomó tras 28 días en ausencia de riegos.

Microbacterium sp 3J1 fue elegido para realizar esta experiencia, ya que a escala de laboratorio y en ausencia de riegos indujo en las plantas inoculadas niveles significativos de PF, PTT, PS, CRA e IRA respecto control negativo. El tratamiento estadístico se basó en el análisis de la varianza de los datos.

El xeroprotector utilizado para unir la cepa a las semillas fue el xeroprotector sintético S4J2A2-D. Para encapsular las células de *Microbacterium* sp 3J1 en las semillas de rábanos se siguió el procedimiento descrito en el apartado 10.2 de *Materiales y métodos*. Se suministró $3,27 \cdot 10^{10}$ UFC por cada 60 semillas. Como control positivo se utilizaron semillas inoculadas con *P. putida* KT2440. Como control negativo se utilizaron semillas tratadas con cloroformo sin ninguna cepa.

Como se muestra en la figura 41 tras 28 días sin riego, solo los rábanos con *Microbacterium* sp 3J1 sobrevivieron. Mientras que las plantas con *P. putida* KT2440 se encontraban marchitas.



Figura 41 - Estado de las plantas de rábanos tras 28 días sin riego. Se muestran los especímenes de mayor tamaño conseguidos. De izquierda a derecha, rábanos con: *Microbacterium* sp 3J1, sin inóculo (C-) y con *Pseudomonas putida* KT2440 (C+).

La tabla 10 resume los resultados obtenidos del cultivo de rábanos inoculados bajo estrés hídrico, en la que se aprecia que sólo se registraron datos para las plantas inoculadas con *Microbacterium* sp 3J1, ya que las plantas con *P. putida* KT2440 y sin inóculo se encontraron marchitas tras 28 días en ausencia de riegos.

Tabla 10 – Resumen de resultados de plantas de rábanos inoculados y cultivados en huerto.

Inóculo/Parámetro	Raíz (cm)	Tallo (cm)	PF (g)	PTT (g)	PS (g)	CRA	PRA (g)	IRA (g)
C- (Sin inóculo)	7±2,1	2±1,2	4,2±2,1	5,1±1,9	1,4±1,88	0,29±0,01	0,9±0,8	2,8±1,1
C+ (<i>P. putida</i> KT2440)	7,8±1,1	2,2±0,9	4,4±1,9	5,3±2,1	1,9±2,1	0,33±0,03	0,88±0,9	2,6±2,1
<i>Microbacterium</i> sp 3J1	18,3±4,16	6,33±1,55	67,3±8,51	71,3±7,02	4,77±1,21	0,94±0,03	4±1,73	62,6±8,3

Como en los estudios realizados a escala de laboratorio las plantas inoculadas con *Microbacterium* sp 3J1 mostraron que los valores de PTT y PS mostraron un patrón

Resultados – Capítulo 3°

similar al del PF, pero con mayores y menores unidades respectivamente. Además presentaron un CRA de 0,94 muy próximo al máximo teórico. Así, como era de esperar también presentó un elevado valor del IRA con más de 60 g de agua retenida; mientras que para el valor del PRA se registró 4 g de agua recuperada. Un tratamiento estadístico basado en el análisis de la varianza evidenció que las plantas inoculadas con *Microbacterium* sp 3J1, mostraron diferencias significativas respecto a los controles negativos y positivos en longitud de raíz, PF, PTT, CRA e IRA.

DISCUSIÓN

Discusión

Distintos microorganismos presentan distintos niveles de tolerancia a la desecación. Así tal y como se ha indicado en la introducción los dos grupos taxonómicos que presentan mayor nivel de tolerancia son *Actinomycetes* y *Corenyformes* pertenecientes al filo *Actinobacteria*. Esta mayor tolerancia está determinada por distintos mecanismos fisiológicos que estos microorganismos han desarrollado. Así, entre otros encontramos la capacidad de producir moléculas que protejan contra los daños de la desecación a sus biomoléculas tales como lípidos de membrana, proteínas y otras. Entre estas moléculas protectoras se han descrito anteriormente solutos compatibles que son compuestos de naturaleza química, de pequeño tamaño y que permiten a los seres vivos que los producen, estabilizarse frente a situaciones de estrés ambiental y entrar en un estado de latencia hasta que las condiciones vuelvan a ser favorables. Estos seres vivos reciben el nombre de organismos criptobióticos. Cuando el agente de estrés ambiental que induce la síntesis de solutos compatibles es el déficit hídrico, los organismos criptobióticos reciben el nombre de anhidrobiontes. Vilchez et al. (2007) dieron el nombre de xeroprotectores a los solutos compatibles sintetizados por los anhidrobiontes.

La búsqueda de nuevos xeroprotectores con aplicaciones biotecnológicas es de gran interés a nivel farmacéutico y médico, donde la industria relacionada con la estabilización de tejidos, células y proteínas mueve un mercado de 500 billones de dólares (Potts et al., 2005). No obstante, nuevas aplicaciones desarrolladas para los xeroprotectores los hacen también interesantes en otras áreas, que van desde la industria bioquímica, alimentaria, agrícola e incluso en procesos de biorremediación de ambientes contaminados. Estos estudios requieren de la búsqueda y el aislamiento de nuevos anhidrobiontes, que a su vez permitan profundizar en el conocimiento de las bases de la anhidrobiosis. El aislamiento de nuevos organismos tolerantes a la sequía, abre también un importante abanico de posibles aplicaciones biotecnológicas, demostrando el potencial de los recursos que encierra la biodiversidad microbiana y la importancia de su estudio.

Para el aislamiento de nuevas cepas bacterianas tolerantes al déficit hídrico, es necesario desarrollar una nueva metodología de selección de organismos anhidrobiontes. Por esta razón y basándonos en estudios previos del grupo, hemos desarrollado una técnica de aislamiento basada en el uso del cloroformo como agente selectivo. El cloroformo es un compuesto químico utilizado como desinfectante, capaz de matar células vegetativas

Discusión

aunque no a sus esporas (McDonnell and Russell, 1999). No obstante, nuestro grupo demostró con anterioridad que células de *Pseudomonas putida* KT2440 estabilizadas en presencia de xeroprotectores como la trehalosa o la hidroxiectoína, eran capaces de superar un tratamiento con disolventes orgánicos, entre ellos el cloroformo; mientras que las mismas células desprovistas de xeroprotectores dejaban de ser viables a causa de los efectos deletéreos del cloroformo en lo que se denominó como esporas artificiales (Vilchez et al., 2008). En base a estos resultados definimos la hipótesis de que bacterias silvestres estabilizadas por xeroprotectores, podrían ser aisladas de muestras de suelo seco utilizando cloroformo como agente selectivo.

El contacto con el cloroformo provocó un descenso de la supervivencia bacteriana a medida que aumentó el tiempo de tratamiento, lo que confirma el efecto deletéreo del cloroformo sobre las bacterias. Para explicar que el descenso sea progresivo con el tiempo, propusimos dos teorías. Por un lado podría ser consecuencia de una permeabilidad limitada del disolvente a las partículas de tierra, a pesar del proceso de homogenizado de las muestras de suelo realizado en el ensayo y por otra parte, a pesar de que las muestras de suelo se encontraban secas no se puede descartar que la humedad ambiental pudiera disolver las cubiertas xeroprotectoras con el tiempo, quedando expuestas las células vegetativas y metabólicamente activas al contacto con el cloroformo. Así podemos explicar el descenso paulatino de la supervivencia celular. Para determinar si se trata de este último caso, se podrían utilizar muestras de suelo con distintos niveles de humedad y observar el grado de reducción en la supervivencia.

Anteriormente mencionamos que las esporas bacterianas si son tolerantes al tratamiento con cloroformo, por lo que hubiera sido esperable un aumento progresivo con el tiempo de la proporción de bacterias esporulantes. No obstante, este efecto dejó de observarse a partir del minuto 60, cuando el porcentaje de cepas esporuladoras alcanzó el 80% del total lo que parece indicar que el período de difusión del cloroformo en el suelo alcanzó el nivel máximo a los 60 minutos, proponiendo de esta forma un efecto compartido entre difusión limitada del cloroformo durante los primeros 60 minutos conjuntamente con el efecto producido por los restos de agua presentes en la muestra como responsables de la disolución de los xeroprotectores y el descenso paulatino del nivel de supervivencia. Proponemos por lo tanto un paso previo de secado adicional en el laboratorio para retirar los restos de agua presentes en la muestra y aumentar de esta

Discusión

forma la eficacia del método de obtención de organismos anhidrobiontes del suelo. Esta situación parece indicar que un tratamiento de una hora con cloroformo es suficiente para eliminar las células vegetativas presente en el suelo. Por otro lado, aproximadamente un 15% de células bacterianas toleraron el tratamiento al cloroformo por mecanismos distintos a la esporulación. Nosotros proponemos que estas cepas podrían encontrarse estabilizadas por xeroprotectores de forma análoga a la protección observada en las esporas artificiales de *E. coli* y *P. putida*. Para confirmar esta hipótesis, proseguimos nuestros estudios con las 77 cepas caracterizadas como no esporulantes aisladas tras el ensayo de esporulación. Anteriormente este ensayo fue validado para células de *B. subtilis*, *E. coli* y de *P. putida* KT2440 (Manzanera et al., 2004a; Vilchez et al., 2008) y aquí nuevamente para células de *B. cepacia* y de *B. pumilus*. La afiliación filogenética de las cepas aisladas coincidió con grupos taxonómicos caracterizados como muy tolerantes a la desecación apuntando por lo tanto nuevamente a la validez de este ensayo, ya que todas las cepas seleccionadas se asocian a géneros no esporulantes.

Una vez descartado que las cepas toleraran el tratamiento al cloroformo por esporulación, decidimos estudiar si el mecanismo de tolerancia al cloroformo respondía a su carácter de ser organismos anhidrobiontes y por tanto podrían tener capacidad para producir xeroprotectores, que igualmente les protegieran del ataque por disolventes orgánicas. De esta forma sometimos las cepas aisladas a un tratamiento de secado al aire para determinar su nivel de tolerancia a la desecación. Existen distintas técnicas para determinar su nivel de tolerancia a la desecación presentada por distintos microorganismos (Potts, 1994). La técnica empleada por nosotros fue la de secado al aire como se describió en el apartado 3.4 de la *Introducción*. Dado que esta técnica permite emplear un fenómeno de desecado más intenso para poder discriminar cepas que provienen de un intenso proceso de secado natural como es la sequía estacional propia del área de muestreo. Además esta técnica conlleva concentración de sales, por que las moléculas xeroprotectoras actuarían también como osmolitos y podrían recuperarse por técnicas semejante al ordeñado bacteriano propuesto por Sauer y Galinski (1998) (Potts, 1994). Los resultados de tolerancia a la desecación mostraron que las cepas con mayor tolerancia a la desecación se aislaron de muestras de suelo tratadas con cloroformo, a excepción de las cepas 2J8 y 3J1. Este efecto podría darse gracias a que las cepas aisladas sean más eficientes en la producción de cubiertas

Discusión

xeroprotectoras que funcionen frente al cloroformo y a la desecación (Vilchez et al., 2008). No obstante no podemos descartar que intervengan otras estrategias de adaptación a la desecación como la síntesis de proteínas especializadas (Potts et al., 2005; Rebecchi et al., 2007), la producción de EPS (Billi et al., 2000), alteraciones en el contenido lipídico de la membrana (Ritter, 1993) u otras modificaciones fisiológicas.

Para validar el uso del cloroformo como agente selectivo de bacterias anhidrobiontes, se realizó un nuevo aislamiento utilizando muestras de suelo distintas a las empleadas con anterioridad. Las muestras de suelo se incubaron durante 60 minutos con cloroformo. Análogamente a la primera ronda de aislamientos, se generó un porcentaje de esporulantes inferior al aislamiento anterior y un porcentaje de anhidrobiontes hipertolerantes a desecación similar al caso anterior, lo que valida nuevamente que con el sistema de selección con cloroformo se obtienen 10 veces más anhidrobiontes hipertolerantes a desecación que sin sistemas de selección. Estos resultados son también consistentes con los presentados por otros aislamientos realizados en nuestro grupo a partir de rizosfera de *Spartum junceum* (Santacruz-Calvo L., Comunicación personal). Además durante el procedimiento de aislamiento, se incluyó siembras en medios con HPA's con el fin de seleccionar bacterias xerotolerantes y resistentes a la presencia de estos contaminantes. De esta forma, se demostró que la metodología de aislamiento propuesta permitía seleccionar organismos anhidrobiontes que además presenten otros caracteres de interés. Así se abre un abanico de posibilidades para el aislamiento de cepas xerotolerantes y PGPR o xerotolerantes y degradadoras de tóxicos, etc.

Por otro lado, la identificación taxonómica ha demostrado que las cepas aisladas pertenecen a grupos taxonómicos con alta tolerancia a la desecación como son las actinobacterias. Destacamos en este sentido la selectividad del método con respecto a la selección de especies de género *Arthrobacter*, dado que el porcentaje de selección de los aislados hipertolerantes a desecación de los 3 aislamientos mencionados pertenecieron a este género al menos en un 40% , el cual se encuentra en el suelo como uno de los géneros prominentes (Lee et al., 2003).

En el caso de la cepa 3J1, su identificación taxonómica muestra una mayor similitud con especies del género *Microbacterium*. Los organismos descritos con mayor similitud a este aislado se han encontrado en diversos nichos ecológicos, destacando muchos de

Discusión

ellos por su falta de agua como son aislados en muestras de esquistos (Vedler et al., EF540512), muestras de profundidades terrestres (EU446169), en piel humana (Grice and Kong EU539211), o plumaje de estorninos (Lucas et al., DQ486943). También se ha encontrado en lugares donde pese a existir agua, ésta no está habitualmente disponible dado que se encuentra en forma de hielo, como en glaciares del Monte Everest (Liu Y. EU584507) o en la meseta tibetana (EU375379). También es de interés que se ha encontrado en zonas hipersalinas como salmueras (Wu et al., EU532496), o en las excavaciones arqueológicas de minas de sal de Kunming en China (Xiao et al., DQ358653). La asociación de estas cepas con alto grado de identidad a microorganismos rizosféricos también queda patente como es el caso descrito por Peterson y colaboradores (2006) (DQ5301448), o asociadas a musgos (AM268326) o a alisos usados para eliminación de níquel (DQ412989) o involucradas en el ciclo del nitrógeno en la rizosfera (EU723168). En general se puede concluir que existen muchas cepas con gran nivel de identidad asociadas a procesos de biorremediación ya que están involucradas no solo a tratamientos de metales pesados (EU036699; EF091839) si no también involucradas en la eliminación de compuestos recalcitrantes como son el dibenzotiofeno, o como el fenantreno (EU196564). Para este último contaminante se ha descrito a la cepa *Microbacterium* sp Sphe1 (Zhang et al., 2004). A nivel bibliográfico no se han encontrado referencias que avalen la producción de moléculas estabilizantes ante desecación por este género. No obstante, Ortega-Morales *et al* han caracterizado el EPS producido por una cepa de *Microbacterium* (Ortega-Morales, 2006), que debe proteger a la población de este microorganismo de la desecación (de Winder, 1990; Ortega-Morales, 2001; Potts, 1994b).

En el caso concreto de la cepa 4J2A2, su afiliación taxonómica la asemeja al género *Rhodococcus*. En el mismo género, se han encontrado cepas de las especies *R. opacus* y *R. jostii* con capacidad para sintetizar ectoína y trehalosa (en menor medida) ante situaciones de desecación (LeBlanc, 2008). Alvarez y colaboradores propusieron que estas dos moléculas presentan una particular prevalencia en todo el género. Estos autores describieron la producción de EPS en *R. opacus* frente a condiciones de desecación (Alvarez, 2004).

Por otra parte, la cepa 4J7B1 se asemeja taxonómicamente a *Leucobacter alluvii*. No existen datos en la bibliografía que indiquen mecanismos de tolerancia a desecación en

Discusión

esta especie, ni en otras de su género. No obstante, se trata de un género muy poco estudiado. Morais y colaboradores afirmaron que las colonias de *L. alluvii* presentan una morfología esférica al crecer en medio líquido en presencia de un 8% de sal (Morais, 2005), lo que podría asemejarse al mecanismo de tolerancia a la desecación propuesto por Papendick (Papendick, 1981).

En lo que respecta a la cepa 4J27, su identificación taxonómica la agrupa en el género *Arthrobacter*. Dentro de este género la trehalosa se encuentra en una gran proporción. En estado estacionario, la cantidad de trehalosa suele ser estable, mientras que el glucógeno varía en función de la cantidad de glucosa disponible (Zevenhuizen, 1992). La trehalosa en este género actúa protegiendo a membranas y enzimas frente a la desecación (Crowe, 1986). En otra especie de este género, *Arthrobacter crystallopolietes*, se observó una modificación de su aspecto formando colonias esféricas ante situaciones de desecación (Boylen, 1973), lo que nuevamente parece imitar el mecanismo propuesto por Papendick (Papendick, 1981).

Las cepas 5J12A, JN1, JP1G, JF1 y JN1 taxonómicamente se asocian también al género *Arthrobacter*, por lo que las características descritas en el párrafo anterior son aplicables a estas cepas.

Del análisis del ARNr 16S podemos deducir que la cepa JF6 pertenece al género *Microbacterium*. Aunque la cepa con la que presentó mayor similitud filogenética (EU714371) no fue aislada de ambientes desecados, sí lo fueron otras cepas con las que la similitud de su ARNr 16S compartía un 99% de identidad. Entre ellas se encuentra la cepa 3J1 seleccionada en el primer aislamiento (GU815136) o la cepa de *Microbacterium* sp CME 1 (AY547556) aislada de un entorno salino y con actividad PGPR. Otras cepas con las que su ARNs 16S también compartía un 99% de identidad, presentaron actividad PGPR como en el caso de la cepa *Microbacterium* sp B 229 (HM234007), o de la rizobacteria diazotrofa aislada de las raíces del té *Microbacterium oxydans* X H0903 (GQ279110).

Cabe destacar que todas las cepas aisladas pertenecen a la clase *Actinobacteriae*, orden *Actinomycetales*, que han sido descritos como uno de los taxones más resistentes a desecación (Abyzoz, 1993; Gilichinsky, 1992; Jhonston, 1991; Potts, Unpublished data;

Discusión

Sakane, 1993; Sneath, 1962), lo que parece indicar que la metodología de aislamiento propuesta en base al empleo de disolventes orgánicos para la selección de bacterias anhidrobiontes es un sistema eficaz capaz de aumentar 10 veces la probabilidad de aislar este tipo de microorganismos, independientemente del suelo empleado y cuando esté lo suficientemente seco.

Caracterizada la naturaleza anhidrobionte de las cepas seleccionadas nos propusimos identificar alguno de los mecanismos involucrados en dicha tolerancia, entre los que destacaba identificar si eran productoras de xeroprotectores. Con el fin de obtener dichas moléculas xeroprotectoras optamos por utilizar una variación del método de ordeñado bacteriano (Sauer and Galinski, 1998), dado que este método se utiliza de forma exitosa para la extracción industrial de otros xeroprotectores como son la ectoína y la hidroxiectoína, moléculas con capacidad xeroprotectora de proteínas y células (Schwarz et al., 2006). También desarrollamos una variante del método de extracción, basado en la obtención de moléculas con actividad protectora frente a la desecación mediante una segunda técnica, para discriminar entre los solutos compatibles producidos en respuesta a aumentos en la concentración de sales del medio y aquellos producidos como respuesta al estrés hídrico, por exposición de la cepa a una intensa corriente de aire estéril seguida de choque por exposición al agua. Para obtener los solutos compatibles por el primer método, fue necesario caracterizar los niveles de tolerancia de las cepas a distintas concentraciones de NaCl para poder inducir la síntesis de los osmolitos sin perder la viabilidad de las células. Debido a ello se desarrolló una nueva metodología basada en ensayos previos de halotolerancia. De estos ensayos se deduce que altos niveles de tolerancia a la desecación no están necesariamente ligados a altos niveles de halotolerancia. Los ensayos se realizaron en matraz con adición de sal en dos pasos, y no en fermentador con aumento progresivo de la concentración de sal como ocurre con el método desarrollado por estos autores. De esta forma se ahorra tiempo y material de laboratorio, ya que no se pretende producir POBs en grandes cantidades sino encontrar nuevas formulaciones xeroprotectoras. No obstante, estos estudios podrían teóricamente ser fácilmente escalados a nivel de planta piloto en fermentador.

De los estudios de halotolerancia deducimos que las horquillas de concentración de NaCl óptima comparada con la máxima tolerada es variable según la especie siendo

Discusión

Rhodococcus sp 4J2A2 la que mostró una horquilla más estrecha (0,2 – 0,4 M) y *Microbacterium* sp 3J1 la que mostró la horquilla más ancha (0,2 – 1,6 M). Estos resultados inicialmente podrían parecer que supusiera una correlación entre la tolerancia a la concentración de NaCl y a la desecación. Sin embargo, esto queda descartado ya que *Arthrobacter* sp 4J27 alcanza niveles de halotolerancia inferiores a los de *Arthrobacter* sp 5J12A, siendo esta última más tolerante a la desecación que la primera por lo que la exposición de una cepa a estrés osmótico y de la misma cepa a estrés por desecación da a lugar a respuestas fisiológicas distintas, como también ha sugerido Cayley (1991) y Potts en distintos estudios (Potts, 1994; Potts, 1980; Potts, 1985). Esto queda igualmente demostrado por los análisis de RMN de la composición de los POB y POBSIAs, que presentan formulaciones distintas.

Sin embargo no descartamos que existan mecanismos compartidos de tolerancia a la desecación que se utilicen igualmente en los casos de halotolerancia. Este puede ser el caso para la cepa *Microbacterium* sp 3J1, la cual produce POBs y POBSIAs de composición muy similar, con la excepción de la fucosa solo presente en N3J1-S (POB) pero no en N3J1-D (POBSIA).

Como hemos indicado anteriormente, el caso de *Arthrobacter* sp 4J27 es el de una cepa destacada por su halotolerancia y tolerancia a la desecación pero donde solo la glucosa aparece como elemento común en su POB (N4J27-S) y POBSIA (N4J27-D) respectivos, no pudiendo descartar que esta provenga del medio ya que fue la fuente de carbono adicionada al mismo.

Por otro lado, el estudio por RMN para determinar la composición de POBs y POBSIAs, demostró la presencia en ciertos POBs de los siguientes compuestos químicos. En primer lugar se observó al aminoácido glutamina, descrito anteriormente como osmolito sintetizado por *Hallobacillus halophilus* (Saum et al., 2012), *P. aeruginosa* (Sagot et al., 2010) o *Erwinia chrysanthemi* (Goude et al., 2004) ante estrés osmótico; el análisis por RMN también mostró la presencia del ácido glutámico, descrito previamente también como osmolito en *H. halophilus* (Saum and Müller, 2007), *Halomonas sinaiensis* (Romano et al., 2007) o *Erwinia chrysanthemi* (Goude et al., 2004); respecto al hidroxibutirato también ha sido descrito en estudios previos como osmolito en la cepa *Pseudomonas* sp CT13 (Soto et al., 2012); además se observó

Discusión

acetato que previamente también se describió en *E. coli* como osmolito (Jovanovich et al., 1989). El análisis por RMN también evidenció la presencia de valina, lactato, ácido oxoglucurónico, fucosa y piruvato en los POBs, siendo la primera vez que se describe la síntesis de estos compuestos químicos ante estrés osmótico por cepas bacterianas, al menos en nuestro conocimiento. Por otro lado, el estudio por RMN de la composición de los POBSIAs mostró la presencia de los mismos compuestos químicos que en los POBs, aunque con distintas concentraciones. En este caso, ninguno de los compuestos químicos citados anteriormente han sido descritos como solutos compatibles sintetizados ante estrés hídrico, al menos en nuestro conocimiento. Respecto a la presencia de glucosa y fructosa en ciertos POBs y POBSIAs, probablemente sea consecuencia de su uso como fuente de carbono en los medios de cultivos. Por último, el análisis por RMN también evidenció la presencia del disacárido trehalosa en algunos de los POBs y POBSIAs, siendo el único de los compuestos químicos identificados cuya síntesis como estrategia de adaptación frente a situaciones de estrés osmótico e hídrico sí ha sido descrita con anterioridad (Arakawa and Timasheff, 1985; Billi et al., 2000; Goh et al., 2011; Potts, 1994a; Potts et al., 2005).

En cuanto a la capacidad para estabilizar la lipasa por parte de los distintos productos obtenidos, destacamos la incapacidad aparente del POB de la cepa *Rhodococcus* sp N4J2A2-S, muy por debajo del nivel generado por cualquier otro POB y sobre todo del de su homólogo N4J2A2-D producido por la misma cepa pero ante estrés por desecación, la cual parece venir determinada por la presencia adicional de lactato y β -hidroxibutirato en el POBSIA que no se encuentra en el POB.

Destacamos en este sentido que solo 2 POBs fueron capaces de mantener activa la enzima a lo largo de los 150 días de ensayo (N4J27-D y N5J12A-D), siendo ambos productos extraídos en respuesta a la desecación por aire y no al choque osmótico. De ambos casos, el resultado más sorprendente fue el del generado a partir de N5J12A obtenido tanto por ordeñado estándar (N5J12A-S) como por incubación al aire (N5J12A-S), dado que su composición está integrada principalmente por glucosa, un azúcar considerado menos eficaz como xeroprotector en el largo plazo que la trehalosa presente en N4J27-D, por lo que suponemos que bien el acetato, el lactato o la valina podría tener un papel en mejorar la eficiencia de azúcares reductores como la glucosa.

Discusión

Además no descartamos el papel de los polímeros (aparentemente ADN) presentes en el xeroprotector N5J12A-D para funcionalizar la glucosa.

Llama la atención de la gran bajada del potencial estabilizador de enzimas del POB y POBSIA N3J1-S y N3J1-D, debido al alto nivel de supervivencia de la cepa *Microbacterium* sp 3J1 en el tiempo, que podría presuponer un mayor nivel de efectividad al menos de su POBSIA (N3J1-D).

Nuevamente se observa que los xeroprotectores N4J27-D y N5J12A-D fueron significativamente más eficientes en la xeroprotección de células de *E. coli*, tal y como ocurrió con la estabilización por secado de la enzima lipasa. Estos resultados apuntan a que ambos xeroprotectores son capaces de proteger un amplio abanico de biomoléculas que la trehalosa no alcanza a conservar. Además hemos de destacar la gran diferencia en los niveles de supervivencia observados cuando la composición empleada fue N5J12A-D en lugar de N5J12A-S cuya composición es muy similar e incluso los compuestos como el acetato, el lactato o la valina se encuentran en menor proporción, lo que podría indicar que existen otros componentes no identificados con un papel relevante en la protección y que quizás sean las moléculas de naturaleza polimérica no identificadas por RMN. Esta hipótesis queda reforzada por el hecho de que las mezclas sintéticas del tipo S5J12A-D presenten valores de estabilización más bajos que el correspondiente S5J12A-S, lo que ocurre de forma generalizada para todas las mezclas sintéticas cuando se comparan con la trehalosa a excepción de S4J2A2-D.

Por otra parte la tecnología desarrollada para valorar la capacidad protectora de los POBs y POBSIAS de enzimas por estabilización frente a la desecación se propone como un método alternativo para la búsqueda de xeroprotectores y la valoración de su eficiencia en el campo de la estabilización por secado. Se seleccionó la enzima lipasa como proteína modelo, ya que permite un ensayo rápido, fácil y económico. Por otra parte, gracias a los ensayos preliminares hemos puesto a punto la metodología para poder usar la lipasa como modelo de enzima sensible a la desecación. En estos ensayos hemos vuelto a observar la capacidad de la trehalosa para estabilizar esta enzima, con resultados de actividad altos tras el ciclo de secado y rehidratación. No obstante, existen grandes variaciones de un ensayo a otro ya que los ensayos fueron independientes y difieren en factores relevantes como la humedad relativa o la temperatura ambiental.

Discusión

Como se observa en la *figura 10*, destacamos que todos los POBs y POBSIAs naturales aislados de las cepas en estudio, son válidos para la estabilización de lipasa procedente de *B. cepacia*, generando una protección superior al control negativo en ausencia de aditivo alguno. Esta diferencia es estadísticamente significativa basada en el cálculo de la *t*-Student.

De los estudios de estabilización de células procariotas con los POBs y POBSIAs aislados, hay que tener en cuenta que se utilizó la cepa de *E. coli* MC4100, caracterizada como xerosensible en estudios previos (Manzanera et al., 2004b). Sin embargo hemos de considerar que estos estudios no son necesariamente extrapolables a otros microorganismos ya que tal y como se ha descrito anteriormente, xeroprotectores eficaces para esta cepa como es la trehalosa no sirven para la estabilización de otros microorganismos gram negativos como *P. putida* KT2440 (Manzanera M., comunicación personal). Como se aprecia en la *figura 8* de *Resultados*, las células estabilizadas en POBSIAs mostraron niveles de supervivencia superiores al control positivo de trehalosa tras 55 días de almacenamiento. Un tratamiento estadístico basado en el cálculo de la *t*-Student evidenció que estas diferencias eran significativas. De nuevo los POBSIAs mostraron niveles de estabilización superiores a los POBs. Esto podría ser explicado ya que el proceso de retirada de agua durante la estabilización de lipasa y *E. coli* es similar al utilizado en el protocolo de obtención de POBSIAs. Se sugiere una respuesta específica de las cepas estudiadas ante estrés por desecado y estrés osmótico, basada en la síntesis de POBs y POBSIAs de distinta composición.

Con el fin de verificar la anterior hipótesis propusimos el estudio de la capacidad estabilizadora de mezclas sintéticas en base a la composición química de los POBs y POBSIAs naturales. Para ello se procedió a identificar la composición química tanto de POBs como de POBSIAs por análisis de Resonancia Magnética Nuclear. Estos resultados muestran que la cepa *Arthrobacter* sp 4J27 acumula trehalosa, además de glutamina y glucosa, cuando se utiliza el protocolo de obtención por desecado de xeroprotectores pero no cuando se utiliza el de estrés osmótico. Esto podría explicar que los POBSIAs de *Arthrobacter* sp 4J27 obtuvieron un mayor nivel de protección de las células que los POBs sintetizados por la misma cepa. Sin embargo, el otro aislado del género *Arthrobacter* (5J12A) produjo un POBSIA de composición diferente con glucosa, acetato, lactato y valina, lo que sugiere que la síntesis de trehalosa no es un

Discusión

mecanismo generalizado dentro de este género para lograr la protección frente a la desecación. Es de destacar el pequeño tamaño de estas moléculas, así como la presencia de varios grupos hidroxilo, lo que parece apoyar la teoría de sustitución o reemplazamiento del agua como mecanismo de acción de estas moléculas. Además, es probable que múltiples estrategias alternativas basadas en la acumulación de xeroprotectores se hayan desarrollado por especies de *Arthrobacter* para resistir largos períodos de calor, frío, salinidad y desecación (Zevenhuizen, 1992). Para el caso del *Rhodococcus* sp 4J2A2 se observó la presencia de fructosa, ácido glutámico, β -hidroxibutirato, acetato y lactato en los POBSIAs. Especialmente destacable es la diferencia en el nivel de estabilización de lipasa (entre 2 y 3 veces superior) comparada con los POBs producidos por la misma cepa, lo que pone de manifiesto el importante papel que juega el β -hidroxibutirato y el lactato en el POBSIA. Sorprendió la ausencia de trehalosa, ya que se han descrito otras especies del mismo género capaces de acumularla junto a ectoína e hidroxiectoína (Alvarez, 2004; LeBlanc, 2008). En este sentido hemos de indicar que no podemos descartar que el proceso de obtención del POBSIA suponga una limitación de xeroprotectores con este papel en el citoplasma celular pero que no se liberen al medio utilizado en este método. Esto se podría comprobar estudiando la presencia de moléculas generadas ante señales de desecación a nivel intracelular utilizando para ello toda la biomasa celular desecada. Además para validar el papel de estas moléculas como xeroprotectores dentro de este género, sugerimos el estudio de la producción de fructosa, ácido glutámico, acetato, β -hidroxibutirato y lactato bajo condiciones de escasez hídrica en otras especies del género *Rhodococcus* para determinar así, si existen mecanismos comunes para luchar frente a la ausencia de agua dentro del género. También es de destacar la producción de trehalosa en *Microbacterium* sp 3J1, siendo la primera vez que se describe (al menos en nuestro conocimiento) la síntesis de este disacárido como osmolito y como xeroprotector en cepas pertenecientes a este género. Tanto en el POB como en el POBSIA la presencia relativa de trehalosa fue alta, lo que parece indicar un papel relevante en su rol como xeroprotector. El resto de compuestos identificados coincidieron tanto en POBs como en POBSIAs (lactato, ácido oxoglucurónico, glutamina y piruvato), las diferencias identificadas en la cantidad relativa presente en los xeroprotectores, las cuales fueron superiores en todos los casos en los POB (N3J1-S). Además se detectó la presencia del azúcar fucosa en gran cantidad en el POB que no se apreció en el POBSIA (N3J1-D). Los resultados de actividad lipasa desecada en

Discusión

presencia de POB y POBSIA mostró niveles similares de actividad, lo que indica que la fucosa no tiene un papel relevante en la estabilización de proteínas pero sí en procesos de estabilización global de la célula y que quizás se trata de un mecanismo compartido con los procesos de halotolerancia.

Un hecho sorprendente es la presencia de azúcares reductores tales como fructosa o glucosa en los xeroprotectores. Estos azúcares reductores se encuentran junto a otros compuestos como la valina, glutamina y el resto de compuestos presentes tanto en los POBs como en los POBSIAs, los cuales se han descrito como responsables de promover reacciones de Maillard (o reacciones de tipo “browning”) (Eichner and Ciner-Doruk, 1981). Estas reacciones son perjudiciales en el proceso de estabilización. Una posibilidad es que alguna de los compuestos presentes en los xeroprotectores, u otros no identificados, deberían reducir las reacciones de Maillard y por tanto incrementar el nivel de estabilización. Esta teoría parece estar respaldada tras estudiar los resultados, en los que se observan mayores niveles de estabilización de los xeroprotectores naturales frente a sus homólogos reproducidos de forma sintética, lo que confirma la presencia de alguna molécula en los xeroprotectores naturales, no incorporada en las reconstrucciones artificiales.

Dado que los estudios de RNM indicaban la presencia de macromoléculas en los productos de ordeñado bacteriano, así como en los generados por incubación al aire postulamos que estos podrían corresponderse con polipéptidos, polisacáridos o bien ácidos nucleicos. Tal y como describe Schmidt (2001) las moléculas de interés biológico tienen una variedad de cromóforos UV intrínsecos además de los que están asociados con otros cromóforos UV y visible en la forma de cofactores, grupos prostéticos y sustratos. Así, Las proteínas, dependiendo de su composición de aminoácidos, tienen un espectro de absorción amplio con picos en la región de 275 a 290 nm. Este pico se presenta debido a múltiples contribuyentes de residuos de fenilalanina, tirosina y triptófano y un poco por la cisteína (puentes disulfuro) (Peace et al., 1995), mientras que en los ácidos nucleicos, las bases nucleotídicas son los cromóforos. Estas bases pueden ser protonadas y por lo tanto, los espectros del DNA y RNA y muestran una absorción máxima de 253 nm (guanosina) y 271 nm (citosina), por consecuencia, un polímero de DNA y RNA muestra una amplia y fuerte absorbancia a 260 nm (Sambrook and Russell, 2001). Gracias a esta diferencia en longitud de onda del

Discusión

espectro de absorción podemos apuntar a la naturaleza de los polímeros encontrados en las muestras mediante análisis espectrofotométricos. Dado que las muestras de los POBs absorbieron principalmente a una longitud de onda de 260 nm proponemos que las macromoléculas encontradas se tratan de ácidos nucleicos. Dado que en los ácidos se pueden intercalar moléculas de bromuro de etidio decidimos analizar la capacidad de dichos xeroprotectores de teñirse en presencia de bromuro de etidio durante el proceso de electroforesis en gel de agarosa con presencia de dicho cromóforo. Destacamos en este sentido que los menores niveles de absorción a 260 nm de los POBs analizados se registraron para N3J1-S. También es de destacar que aunque N4J2A2-S; N4J27-S y N5J12A-S presentaron niveles semejantes de absorción a 260 nm, tanto en N4J27-S como en N5J12A-S la mayor intensidad de brillo en gel se registró en una zona equivalente a entre 0,5 y 3 Kb del marcador de peso molecular, lo que parece indicar que se trata de un efecto típico del género *Arthrobacter*. Por otra parte es de destacar que en el caso de N4J2A2-S, esta mayor intensidad se registra en la zona del pocillo. Hemos de recordar en este sentido que las mayores diferencias en la capacidad estabilizadora entre los POBs naturales y sintéticos se estableció en el caso de N4J2A2-S, por lo que apuntamos a que estas moléculas con capacidad de teñirse con bromuro de etidio pueda tener un papel estabilizador importante y que esté asociado íntimamente a moléculas lo que le impide una electroforesis adecuada del mismo. Para determinar si las moléculas con capacidad de unirse al bromuro de etidio se trata de moléculas de ácidos nucleicos se realizaron tratamientos tanto con ADNasa I como con ARNasa, que indicaban que pese a encontrar tanto ADN como ARN en los POBs, era el ADN la molécula que se encontraba principalmente en estas muestras. Por otra parte se hipotetizó que ese ADN pudiera tener algún tipo de efecto sobre el mecanismo estabilizador de los xeroprotectores dado que el ADN es una molécula rica en grupos hidroxilo. Para confirmar esta hipótesis, se realizó un ensayo de xeroprotección de lipasa resuspendida en los POBs N4J27-S y N5J12A-S, que previamente habían sido tratados con ADNasa I para eliminar dicho ADN. Para descartar un desequilibrio molar entre xeroprotectores y lipasa por la adición de ADNasa I, se incorporaron igualmente un número de moles equivalentes de BSA que corrigiera este posible desequilibrio. Destacamos en este sentido que mientras que la adición de BSA no alteraba la capacidad estabilizadora de N4J27-S ni de N5J12A-S, esto sí ocurría cuando se añadió ADNasa I sobre estos xeroprotectores, no teniendo efecto alguno cuando el xeroprotector no tenía origen celular como es el caso de la trehalosa. En base a estos

Discusión

estudios proponemos que un papel de importancia del ADN en los xeroprotectores para la estabilización de la lipasa. Destacamos en este sentido que ya se han asignado otros roles al ADN distintos al propiamente codificante como son el de tener función estructura en la formación de biopelículas (eDNA), como proponen Harmsen y colaboradores (2010). Además tal y como proponen Praveen y colaboradores (2012), este ADN puede incluso excretarse de forma específica en forma de vesículas. No descartamos la posibilidad de que este ADN se sintetice en respuesta a señales de sequía e incluso que se excrete de forma específica, sin embargo para poder afirmar esto necesitaríamos demostrar a través de estudios de microscopía electrónica y de microscopía de fuerzas atómicas.

Para indicar el tipo de biosíntesis y liberación de ADN como xeroprotector frente a situaciones de estrés osmótico se estudió si estaba acompañada de lisis celular y por lo tanto si se trataba de un efecto indirecto o por el contrario de una excreción fisiológica ante señales ambientales. Como muestra la *figura 17.A*, se produjo un incremento de ADN presente en el combinado xeroprotector al incrementar la osmolaridad del medio. Independiente de lisis celular. Así, para explicar el aumento de la concentración de ADN como consecuencia de un aumento de NaCl en el medio propusimos dos hipótesis, basadas por un lado en que sea acumulado para equilibrar el potencial osmótico con el ambiente extracelular actuando como soluto compatible, y por otra parte en la posibilidad de que se de una síntesis y bioacumulación de ADN para evitar reacciones de Maillard entre las distintas biomoléculas de la célula, protegiendo a la célula contra los efectos perniciosos de la desecación. Para corroborar las hipótesis de reducción en las reacciones de Maillard por presencia de ADN, se aisló y purificó el ADN contenido en los POBs N4J27-S y N5J12A-S y se realizó con él un ensayo de xeroprotección de lipasa, con el fin de determinar si ese ADN presentaba propiedades estabilizadoras y podría catalogarse como xeroprotector. Los resultados reflejados en la *figura 16* indican que la lipasa estabilizada en presencia del ADN aislado de los xeroprotectores (A4J27-S y A5J12A-S), presentaba un nivel de actividad significativamente superior al control negativo de agua desionizada y algo menos al presentado por la lipasa cuando se secaba en presencia de trehalosa. Con el fin de determinar si ADN de otro tipo también podría ser utilizado como xeroprotector, se realizó de forma paralela en el ensayo anterior la estabilización de lipasa en ADN total de las cepas *Arthrobacter* sp 4J27, *Arthrobacter* sp 5J12A y *P. putida* KT2440. Así, se

Discusión

observó que estos niveles de estabilización fueron similares a los observados cuando el ADN se obtuvo como ADN total de ambas cepas de *Arthrobacter* pero significativamente superiores a las logradas cuando el ADN provenía de la cepa xerosensible *P. putida* KT2440, lo que parece indicar que no solo la presencia del ADN si no también su origen es importante en el proceso de estabilización de proteínas. Para explicar por qué ADNs de distintos orígenes presentan distintos niveles de xeroprotección, sugerimos que podría deberse a la ubicación de los grupos OH dentro de la secuencia del ADN en función de la secuencia del mismo, aunque esta teoría debe ser confirmada. Destacamos en este sentido que no es el primer caso descrito en el que se le propone al ADN un papel distinto del codificante, ya que estudios anteriores han demostrado como combinaciones de ADN de alto peso molecular con N-acetil glucosalina (NAG) pueden formar un polímero con propiedades adhesivas para el desarrollo de biopelículas (Harmsen et al., 2010; Sahu et al., 2011). Así proponemos que biomoléculas de la célula combinadas con los azúcares reductores, aminoácidos y otras moléculas de los POBs y POBSIAs y el ADN formarían un combinado xeroprotector con propiedades estabilizadoras y protectoras contra la desecación.

Para demostrar esta teoría, nos propusimos que una vez confirmado que distintos tipos de ADN presentan propiedades como xeroprotectores, estudiar tanto si también podrían atenuar las reacciones de Maillard como si podrían mejorar las actividades xeroprotectoras de mezclas sintéticas generadas en base a la composición química de POBs. Hemos de indicar que los resultados de ABS a 410 nm indican que el ADN de las cepas de *Arthrobacter* sp 4J27 y *Arthrobacter* sp 5J12A atenúan la coloración propia de las reacciones de Maillard a una concentración de 2.5 µg/µl. De esta forma, sugerimos un papel fisiológico del ADN presente en el xeroprotector, basado en la compensación del potencial osmótico a manera de soluto compatible y/o como tampón de las reacciones de Maillard, entre los residuos amino de las proteínas y otras moléculas reductoras, ante situaciones de estrés ambiental.

Igualmente como resultado de la incorporación del ADN a las mezclas sintéticas tipo S4J2A2-D se observó una mejora en la capacidad de estabilización por secado de la enzima lipasa, complementando la composición del xeroprotector sintético S4J2A2-D con ADN. Para el desarrollo de este estudio se eligió el xeroprotector S4J2A2-D por presentar altos niveles de estabilización de lipasa y de la cepa *E. coli*. Concretamente se

Discusión

adicionó con ADN de esperma de pescado (SIGMA 74782-10G). Previamente se ensayó si este ADN podía atenuar las citadas reacciones de Maillard. Los resultados reflejados en la *figura 16*, confirmaron esta hipótesis y determinó una concentración óptima de 2,3 µg/µl.

Como se muestra en la *figura 23*, la lipasa estabilizada en el xeroprotector sintético con ADN, mostró un nivel de actividad significativamente superior que la lipasa estabilizada en el mismo xeroprotector sin ADN. Proponemos que ese incremento se debió a la acción moduladora de reacciones de Maillard, dado que esta misma concentración de ADN produjo una reducción de la absorbancia a 410 nm como resultado del seccado de una mezcla de glutamina y glucosa que típicamente produce un color amarillo-marrón como producto de las reacciones de Maillard.

En resumen, proponemos que los ácidos nucleicos desempeñan un papel fundamental en el mecanismo de tolerancia a la desecación de los organismos anhidrobiontes. En este sentido destacamos que uno de los microorganismos más conocidos como xerotolerante es *Deinococcus radiodurans* cuyo número de copias del ADN cromosómico es especialmente alto y que en este sentido no descartamos un papel de estas copias en mecanismos de tolerancia a desecación, además de reparación de ADN. Igualmente presenta propiedades estabilizadoras de biomoléculas y moduladoras de reacciones de Maillard y que parece ser sintetizado expresamente ante señales de estrés hídrico. Por otra parte y desde el punto de vista biotecnológico, esta aproximación permitiría desarrollar xeroprotectores sintéticos más eficientes de interés farmacéutico y comercial.

Por otra parte, estudios anteriores realizados en nuestro grupo han demostrado que las cepas bacterianas seleccionadas pueden actuar tanto como PGPR como cepas que protegen cultivos de tomates, pimientos, maíz y soja en condiciones de estrés hídrico (Vilchez, 2010). Nosotros nos planteamos extender ese tipo a cultivos de plantas y en concreto tomando como modelo al rábano (*Raphanus sativus*). Seleccionamos este espécimen vegetal no solo por su interés agrícola y comercial, sino porque también presenta una serie de características que la hacen ideal para desarrollar posteriores estudios de biorremediación. Su considerable tolerancia a bajas temperaturas, rápido crecimiento, bajos requerimientos agronómicos, bajo coste de cultivo por hectárea

Discusión

(Kurunczi et al., 2008), junto a su capacidad para bioestimular a las poblaciones microbianas autóctonas degradadoras de HPAs (Yi and Crowley, 2007) y bioacumuladora de dicho grupo de contaminantes (Allard et al., 2005), la convierten en el candidato ideal para desarrollar un posible futuro proceso de rizorremediación. Además la posibilidad de utilizar *Raphanus sativus* para la producción de biodiesel (Kurunczi et al., 2008) permitiría poner en valor suelos contaminados con HPAs, durante y tras el posible proceso de rizorremediación.

Una vez seleccionado el espécimen vegetal, el siguiente paso fue optimizar el método de inoculación. Se eligió la metodología de encapsulado de la bacteria sobre la semilla, desarrollada previamente en el grupo. Esta metodología mostró un considerable éxito para la colonización de la bacteria en plantas de maíz (Vilchez et al., 2008). No obstante, se sustituyó el xeroprotector trehalosa por el POBSIA sintético S4J2A2-D. Se realizó este cambio debido al mayor éxito xeroprotector de la reproducción sintética para la cepa xerosensible *E. coli* MC4100, como se observa en la figura 14. La cepa de *Microbacterium* sp 3J1 encapsulada sobre la semilla con S4J2A2-D alcanzó un nivel de colonización similar al conseguido en trehalosa, como se observa en la tabla 12. Por otro lado se realizó un estudio económico, basado en los precios de SIGMA-Aldrich, que reveló un coste del POBSIA sintético S4J2A2-D de un 50% inferior a la trehalosa. Por ello, proponemos sustituir la trehalosa por el xeroprotector S4J2A2-D en la metodología de encapsulamiento de bacterias sobre semillas.

Para comprobar si se producía un efecto xeroprotector de las cepas seleccionadas y encapsuladas sobre las semillas de *Raphanus sativus*, se emplearon una serie de parámetros para recoger la mayor cantidad de información disponible para ayudarnos a discernir acerca de si estas cepas pueden conferir la capacidad de tolerar la sequía a las plantas mediante el seguimiento de su Peso Fresco (PF), Peso Seco (PS) y Peso Totalmente Túrgido (PTT). De la combinación de estos se obtienen otros que muestran la respuesta de las plantas ante condiciones de sequía. Tales indicadores son el Contenido Relativo de Agua (CRA), el Índice de Retención de Agua (IRA) y el Potencial de Recuperación de Agua (PRA) de forma análoga a los propuestos en los estudios realizados por otros autores (Mayak et al., 2004a; Vilchez, 2010; Vilchez et al., comunicación personal).

Discusión

De los resultados obtenidos en el CRA, pudimos observar que todas las plantas inoculadas con las cepas seleccionadas produjeron valores cercanos a 1 (valor máximo), indicando una mejor respuesta ante el estrés hídrico. Estos valores se mantuvieron constante entre los dos puntos de muestreo, salvo para las plantas sin inocular e inoculadas con *Leucobacter* sp 4J7B1 que se encontraban marchitas tras 25 días en ausencia de riegos, así como las plantas inoculadas con *Microbacterium* sp 3J1 que incrementaron considerablemente su valor de CRA respecto al séptimo día del ensayo. Esta cepa es la que mostró una mayor síntesis de ACC-deaminasa en los estudios de Vílchez y colaboradores (comunicación personal). Consideramos que el estrés hídrico fue más acentuado a partir del día 7 y desde ese momento la producción de ACC debió de aumentar por parte de la cepa, produciendo ese incremento del valor del CRA registrado en el día 25 del ensayo. Sin embargo el resto de cepas ensayadas no mostraron este efecto, lo que sugiere que deben de producir la molécula de ACC-deaminasa en gran cantidad desde el inicio del ensayo, o alguna otra molécula no identificada hasta el momento. Además las plantas sin inocular que sirvieron como control negativo se murieron antes del día 25 días en ausencia de riego. Estos resultados están en concordancia con los mostrados en los Penrose y Glick, en los que, al estudiar la capacidad de promoción del crecimiento en condiciones de sequía por mediación de la ACC-deaminasa, se obtuvieron que las plantas inoculadas con bacterias promotoras del crecimiento y con actividad ACC-deaminasa presentaban mayor crecimiento que las no inoculadas en condiciones de sequía (Penrose and Glick, 2001; Vilchez, 2010). Como excepción entre las plantas inoculadas con las cepas seleccionadas, se presentaron las plantas con *Leucobacter* sp 4J7B1, que también se murieron tras 25 en ausencia de riegos. Este hecho llamó mucho la atención, ya que según Vílchez et al. (2010), su nivel de producción de ACC-deaminasa era similar al de las cepas *Rhodococcus* sp 4J2A2 o *Arthrobacter* sp 4J27 que si evidenciaron protección del cultivo frente al estrés hídrico. Esto pone de manifiesto que aunque la producción de ACC es muy importante para la protección de cultivos frente a la ausencia de agua, su producción por parte de la cepa no es suficiente para proteger al cultivo. Otra opción es que la interacción rábano-*Leucobacter* sp 4J7B1 no sea lo suficientemente específica para que se haya producido la producción de la molécula ACC-deaminasa, ya que los ensayos de Vílchez y colaboradores (comunicación personal) se hicieron a nivel bioquímico. Por otro lado, Vílchez y colaboradores finalizaron sus ensayos después de 33 días en ausencia de riegos frente a los 25 días sin riegos a los que se sometieron los

Discusión

rábanos, por lo que es posible que al extender el periodo de desecación hasta los 33 días, los resultados obtenidos en plantas inoculadas con *Rhodococcus* sp 4J2A2 o *Artrhobacter* sp 4J27 se asemejarían a los de las plantas inoculadas con *Leucobacter* sp 4J7B1.

El género *Leucobacter* es poco conocido por lo que no se han descrito cepas PGPR con anterioridad a este trabajo (al menos, en nuestro conocimiento). Por ello podría ser interesante realizar pruebas bioquímicas que manifiestan estas características (ACC deaminasa, producción de fitohormonas, solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno y producción de sideróforos) a las cepas de este género. Ni siquiera en los ensayos realizados con la misma cepa por Vílchez, se registraron resultados similares en las plantas de pimiento y tomate. Esta situación parece indicar una interacción muy específica entre bacteria y planta hospedadora, derivando en resultados muy diversos en función de la planta a xeroproteger.

Para el género *Rhodococcus* no se han descrito cepas que promuevan el crecimiento vegetal en condiciones de estrés hídrico, exceptuando los estudios realizados con anterioridad en nuestro grupo (Vilchez et al., comunicación personal). No obstante si se ha descrito una cepa perteneciente a este género, que si es capaz de promover el crecimiento vegetal de guisantes y que además produce ACC deaminasa (Trivedi et al., 2007), por lo que resultaría interesante comprobar si esta cepa podría proteger plantas en ausencia de riegos. Una situación similar podemos encontrar en el género *Microbacterium* que aunque no se conocen estudios de protección de cultivos, a excepción de los estudios previos realizados en el grupo (Vilchez et al., comunicación personal), frente a la sequía por cepas de este género, si se han descrito cepas promotoras del crecimiento vegetal en *Arabidopsis* (Schwachtje et al., 2012), caña de azúcar (Lin et al., 2012) y trébol (Burch and Sarathchandra, 2006). Por ello, sería interesante caracterizar la promoción del crecimiento vegetal en cultivos inoculados con cepas del género *Microbacterium*, sometidos a estrés hídrico.

Para el caso de los *Artrhobacter*, encontramos no sólo estudios que refuerzan su capacidad de promoción del crecimiento en condiciones no estresantes, sino que también apoyan tal promoción en condiciones estresantes osmóticas (Upadhyay et al.,

Discusión

2009) o los propios resultados de Vílchez, con ensayos realizados bajo estrés hídrico (Vílchez, 2010).

Respecto a los resultados obtenidos del resto de los parámetros, cabe señalar que se denota una clara relación entre los valores de PF y PS a lo largo del ensayo, situación que concuerda con los resultados planteados por Vílchez. Dicha relación se explica porque las plantas pueden tener tanta más agua estructural acumulada conforme más biomasa presenten, es decir, cuanta más biomasa tiene una planta, más agua podrá almacenar esta. Dado que la medida de la biomasa de la planta viene determinada a través de su PS, es lógico que el valor del PF sea proporcional a este, como también indicó Vílchez y colaboradores (2010). Los cambios observados en estas tendencias no fueron significativos.

En el caso de PTT, los resultados fueron análogos a los obtenidos en PF pero algo mayores dado que las plantas en máxima turgencia siempre acumulan más agua que las plantas sometidas a estrés hídrico. Dada esta gran similitud y para poder extraer conclusiones sobre el agua almacenada o retenida por las plantas durante el ensayo, se calculó el PRA de las plantas. Tras 25 días en ausencia de riegos, todas las plantas inoculadas con las cepas seleccionadas, con la excepción ya comentada de aquellas con *Leucobacter* sp 4J7B1, mostraron un valor de PRA similar. Dicho valor también fue similar al registrado para el punto de muestreo tomado al día 7, salvo para las plantas inoculadas con *Microbacterium* sp 3J1 que presentó un valor muy superior. Ese descenso del valor del PRA, definido como la diferencia entre PTT y el PF, entre el día 7 y 25 del ensayo, se debe a un descenso del valor del PTT. Ese descenso podría deberse a una pérdida de la capacidad de retención de agua de las estructuras celulares como consecuencia del estrés hídrico. Entendemos esta hipótesis como la más probable, ya que el valor del PS y del PF para las plantas inoculadas con esta cepa permanece homogéneo entre los dos puntos de muestreo.

Estos efectos se ven reforzados al contrastarlos con los obtenidos para el IRA, definido como la diferencia entre el PF y el PS. De nuevo todas las plantas inoculadas con las cepas seleccionadas, a excepción de aquellas con *Leucobacter* sp 4J7B1, mostraron valores similares de IRA. El efecto xeroprotector de las bacterias inoculadas sobre las plantas queda manifestado en que conservan su PS a lo largo del ensayo. Esa protección

Discusión

de las estructuras celulares se traduce en un mantenimiento del PF también a lo largo del ensayo. Por esta razón las plantas inoculadas con *Microbacterium* sp 3J1, en esta ocasión, si presentan valores de IRA similares al resto de casos. Entonces si el PS y PF se han conservado a lo largo del ensayo, el descenso del PTT se entiende no como una pérdida de la biomasa estructural sino como de su capacidad de retención de agua provocada por los daños ocasionados por el estrés hídrico, como sugerimos en nuestra hipótesis anterior.

Es destacable que las plantas inoculadas con *Microbacterium* sp 3J1, *Arthrobacter* sp 4J27 y *Arthrobacter* sp 5J12A presentaron un valor del IRA significativamente superior al de las plantas control con *P. putida* KT2440. En el caso de las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, bacteria reconocida como promotora de crecimiento (Leveau and Lindow, 2005; Nelson et al., 2002), los valores del IRA se redujeron considerablemente tras 25 días de ensayo. Esta reducción se debió no a un descenso del PS sino a un descenso del PF, lo que se traduce a que el descenso del IRA es consecuencia de una pérdida de la capacidad de las estructuras para retener el agua y no de su biomasa en si.

Las alturas de los tallos de las plantas presentaron una gran similitud con los valores de PF y PTT. Esto viene a apoyar los resultados anteriormente comentados. Todos los casos presentaron valores similares, a excepción de las plantas con *Leucobacter* sp 4J7B1 y sin inóculo que se murieron. El estadístico ANOVA, o análisis de la varianza, confirmó que tal similitud de valores se debió a una alta varianza de dichos valores y que por tanto las diferencias no fueron significativas a efectos de comparación.

En cuanto a la longitud de las raíces observamos que todas las plantas, a excepción de aquellas inoculadas con *Leucobacter* sp 4J7B1 y sin inocular, todas presentan valores similares entre si y respecto al anterior punto de muestreo. Este resultado confirma el efecto xeroprotector que ejercen las bacterias inoculadas en los cultivos. Hasta el momento hemos citado siempre la producción de la molécula ACC-deaminasa, pero en el caso del desarrollo radicular también podría deberse a la síntesis de fitohormonas tipo giberelinas o auxinas (Lopez-Bucio et al., 2007; MacMillan, 2002). Según Vílchez, la cepa *P. putida* KT2440 presentó mayores niveles de producción de la auxina Ácido Indol Acético (Secundo et al.) en ensayos de laboratorio (Vilchez et al., comunicación personal). En base a estos resultados, parecería quedar descartado que la fitohormona

Discusión

responsable de los resultados obtenidos por las plantas inoculadas con *Microbacterium* sp 3J1, *Rhodococcus* sp 4J2A2, *Arthrobacter* sp 4J27 y *Arthrobacter* sp 5J12A sea el AIA. No obstante, y como hemos apuntado con anterioridad, sería necesario realizar estudios de producción de las fitohormonas mencionadas, en la interacción específica efectuada por cada una de las cepas con las plantas de *Raphanus sativus*. Además la cepa *P. putida* KT2440 es especialmente sensible a la desecación (Manzanera et al., 2004c; Manzanera, 2002), por lo que en condiciones de estrés hídrico puede que no pudiese alcanzar la producción potencial de AIA. En cambio, cuando el ensayo se realizó en condiciones de riego, la longitud de las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 fue similar al resto de plantas inoculadas.

Se realizaron también estudios paralelos, relacionados con la degradación de naftaleno por los distintos pares planta-microbio. En todos los casos se apreció una disminución de la concentración del contaminante, sensiblemente superior respecto a la detectada en la rizosfera de las plantas control sin inóculo (datos no mostrados). No obstante estos resultados necesitan ser confirmados.

Como se mencionó en la introducción, las plantas de *Raphanus sativus* pueden ser destinadas a la producción de biodiesel (Kurunczi et al., 2008) por lo que resulta interesante determinar incrementos en las plantas en condiciones de riegos periódicos de agua en función del inóculo añadido.

Todos los parámetros estudiados mostraron valores equivalentes en los casos en estudio, independientemente del inóculo empleado y del punto de muestreo. El tratamiento estadístico aplicado, basado en el análisis de la varianza, no reveló diferencias significativas entre las plantas inoculadas y sin inocular de PF, PS, PTT, CRA, PRA, IRA, así como de longitud de raíz y tallo. A partir de estos resultados sugerimos que las cepas seleccionadas, no ejercen ningún tipo de efecto promotor del crecimiento vegetal en cultivos de rábanos en condiciones ambientales óptimas, a diferencia de lo expuesto por Vilchez y colaboradores (comunicación persona) para cultivos de pimiento y tomates. No obstante queremos resaltar que ambos resultados no son excluyentes, ya que la interacción planta hospedadora-bacteria inoculada es muy específica, y por tanto el efecto promotor del crecimiento puede darse en unas combinaciones y no en otras. Por otro lado, Vilchez y colaboradores (comunicación personal) extendieron sus

Discusión

ensayos durante 33 días frente a los 25 días en rábanos, por lo que sería interesante caracterizar la promoción del crecimiento vegetal de rábanos durante 8 días más.

El siguiente paso fue aplicar los conocimientos desarrollados en el laboratorio a escala de campo. Se propuso producir en huerto una cosecha de rábanos bajo estrés hídrico. Solo se procedió a un riego semanal por inundación durante los primeros 30 días, y la recolección se realizó 28 días después del último riego.

La cepa de *Microbacterium* sp 3J1 fue elegida para realizar el ensayo. Se seleccionó por sus resultados obtenidos a escala de laboratorio y los observados en los estudios de Vilchez *et al.* (2010) en otros cultivos. Como control se emplearon semillas sin ningún tipo de inoculante y como control semillas encapsuladas con la cepa de *P. putida* KT2440. Se estudiaron los parámetros habituales (PF, PTT, PS, CRA, PRA, IRA, longitud de raíz y longitud de tallo).

Sin embargo hemos de indicar que solo se encontraron muestras de plantas en el día 28 del ensayo, cuando estas estaban inoculadas con *Microbacterium* sp 3J1 tras 28 días del comienzo del experimento. Dado que el experimento comenzó en julio de 2011, con la subsecuente elevada insolación diurna y el acentuado estrés hídrico. Las semillas inoculadas con la cepa de *Microbacterium* sp 3J1 toleraron mejor estos factores de estrés. Proponemos en este sentido que estos resultados estaban determinados por ser una cepa con gran capacidad de consumo de ACC (Vilchez *et al.*, comunicación personal), molécula precursora del etileno segregado ante situaciones adversas que favorecen la muerte de la planta en condiciones de estrés hídrico (Egamberdieva *et al.*, 2008; Narváez-Reinaldo *et al.*, 2010; Saleem *et al.*, 2007). Al favorecer la supervivencia y el crecimiento vegetal en ausencia de agua, las plantas inoculadas con *Microbacterium* sp 3J1 podrían haber adquirido una superficie radicular suficiente para alcanzar las reservas de agua del acuífero influyente de la Vega de Granada (Granada, 2001), lo que podría explicar las diferencias entre los resultados de laboratorio y los de campo.

CONCLUSIONS

Conclusions

Based on the obtained results and the consulted bibliographic information, here we present the following conclusions:

- 1- Chloroform can be used as selective agent for the isolation of desiccation tolerant microorganisms. A collection of desiccation tolerant microorganisms of the Actinobacteria phylum including *Microbacterium* sp 3J1, *Rhodococcus* sp 4J2A2, *Leucobacter* sp 4J7B1, *Arthrobacter* sp 4J27 and *Arthrobacter* sp 5J12A were isolated.
- 2- Different extracting protocols can be used for the purification of different xeroprotectants mixtures using bacterial milking products based on osmotic and drought shocks. These protocols were applied to the desiccation tolerant collection with N4J27-D and N5J12A-D being efficient xeroprotectants for the dried stabilization of some sensitive bacterial cells.
- 3- Synthetic xeroprotectant can be developed based on the composition of natural xeroprotecting mixtures. Significant levels of stabilization for proteins were achieved with S3J1-S, S3J1-D, S4J2A2-D, S4J27-S, S4J27-D, S5J12A-S and S5J12A-D. S4J2A2-D also presented high levels of cell dry stabilization.
- 4- We have defined a non-coding new role for DNA. This DNA poses a potential role in dry-stabilization either by cooperative effect on other xeroprotectants or by modulating Maillard reactions.
- 5- Some actinobacteria more specifically *Microbacterium* sp 3J1, *Arthrobacter* sp 5J12A, *Arthrobacter* sp 4J27 and *Rhodococcus* sp 4J2A2 could be used for the protection of radish plants from water stress.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Abril, M.A., Buck M., and R. J.L. 1991. Activation of the *Pseudomonas* TOL plasmid upper pathway operon. Identification of binding sites for the positive regulator XylR and for integration host factor protein. *J Biol Chem* 266:15832-15838.
- Abyzoz, S.S. 1993. Microorganisms in Antarctic ice. 265 - 295 Antarctic microbiology. Hohn Wiley & Sons, Inc., New York.
- Accordino, S.R., D.C. Malaspina, J.A. Rodriguez Fris, L.M. Alarcon, and G.A. Appignanesi. 2012. Temperature dependence of the structure of protein hydration water and the liquid-liquid transition. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 85:031503.
- Afzal, M., S. Yousaf, T.G. Reichenauer, M. Kuffner, and A. Sessitsch. 2011. Soil type affects plant colonization, activity and catabolic gene expression of inoculated bacterial strains during phytoremediation of diesel. *J Hazard Mater* 186:1568-75.
- Ahmad, M., Z.A. Zahir, H.N. Asghar, and M. Asghar. 2011. Inducing salt tolerance in mung bean through coinoculation with rhizobia and plant-growth-promoting rhizobacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Can J Microbiol* 57:578-89.
- Alguacil, M.M., J. Kohler, F. Caravaca, and A. Roldan. 2009. Differential effects of *P. mendocina* and *G. intraradices* on lettuce plants physiological response and aquaporin PIP2 gene expression under elevated atmospheric CO₂ and drought. *Microb Ecol* 58:942-51.
- Alpert, P. 2005. The limits on frontiers of desiccation-tolerant life. *Integr. Comp. Biol* 45:685-695.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-10.
- Alvarez, H.M.S., R.A. ; Cesari, A.C. ; Zamit, A.L. ; Peressutti, S.R. ; Reichelt, R. ; Keller, U. ; Malkus, U. ; Rasch, C. ; Maskow, T. ; Mayer, F. ; and Steinbuchel, A. 2004. Physiological and morphological responses of the soil bacterium *Rhodococcus opacus* strain PD630 to water stress. *FEMS Microbiol. Ecol* 50:75 - 86.
- Allard, A.S., M. Malmber, A.H. Neilson, and M. Remberger. 2005. Accumulation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from creosote-contaminated soil in selected plants and the *Oligochaete* worm *Enchytraeus crypticus*. *Journal of Environmental Science and Health* 40:2057-2072.
- Allensen-Holm, M., K.B. Barken, L. Yang, M. Klausen, J.S. Webb, J.S. Kjelleberg, S. Molin, and M. Givskov. 2006. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol*:1114-1128.
- Allison, D.S.C., B; Randolph, S and Carpenter, F, J. 1999. Hydrogen Bonding between Sugar and Protein is Responsible for Inhibition of Dehydration-Induced Protein Folding. *Arch. Biochem. And Biophys*, 365. 2:289-298.
- Arakawa, T., and S.N. Timasheff. 1985. The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys J* 47:411-4.
- Arakawa, T., S.J. Prestrelski, W.C. Kenney, and J.F. Carpenter. 1993. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews* 10:28.
- Arakawa, T., D. Ejima, K. Tsumoto, M. Ishibashi, and M. Tokunaga. 2007a. Improved performance of column chromatography by arginine: dye-affinity chromatography. *Protein Expr Purif* 52:410-4.

Bibliografía

- Arakawa, T., K. Tsumoto, D. Ejima, Y. Kita, Y. Yonezawa, and M. Tokunaga. 2007b. Induced binding of proteins by ammonium sulfate in affinity and ion-exchange column chromatography. *J Biochem Biophys Methods* 70:493-8.
- Babalola, O.O. 2010. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol Lett* 32:1559-1570.
- Babalola, O.O. 2010. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol Lett* 32:1559-1570.
- Babalola, O.O. 2010b. Ethylene quantification in three rhizobacterial isolates from *Striga hermonthica* infested maize and sorghum. *Egypt J Biol* 12:1-5.
- Babalola, O.O., A.I. Sanni, G.D. ODhiambo, and B. Torto. 2007. Plant growth-promoting rhizobacteria do not pose any deleterious effect on cowpea and detectable amounts of ethylene are produced. *World J Microbiol Biotechnol* 23:747-752.
- Barrutia, O., C. Garbisu, L. Epelde, M.C. Sampedro, M.A. Goicolea, and J.M. Becerril. 2011. Plant tolerance to diesel minimizes its impact on soil microbial characteristics during rhizoremediation of diesel-contaminated soils. *Science of the Total Environment* 409:4087-4093.
- Bashan, Y., G. Holguin, and L.E. de-Bashan. 2004. Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can J Microbiol* 50:521-77.
- Battaglia, M., Y. Olvera-Carrillo, A. Garcarrubio, F. Campos, and A. Covarrubias. 2008. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol.* 148:6-24.
- Benson, E.E. 2008. Cryopreservation theory. *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*:15-32.
- Bienfait, H.F., W. Van den Briel, and N.T. Mesland -Mul. 1985. Free space iron pools in roots. *Plant Physiol* 78:596-600.
- Billi, D., and M. Potts. 2001. Life and death of dried prokaryotes. *Research in microbiology* 153:7-12.
- Billi, D., D.J. Wright, R.F. Helm, T. Prickett, M. Potts, and J.H. Crowe. 2000. Engineering desiccation tolerance in *Escherichia coli*. *Appl. Environm. Microb.* 66:1680-1684.
- Bloomfield, S.F., and M. Arthur. 1994. Mechanisms of inactivation and resistance of spores to chemical biocides. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 23:91S-104S.
- Bomal, C., and F.M. Tremblay. 2000. Dried cryopreserved somatic embryos of two *Picea species* provide suitable material for direct plantlet regeneration and germplasm storage. *Ann. Bot.* 86:177-183.
- Bondoc, C., and J. Burke. 1971. Clinical experience with viable frozen human skin and a frozen skin bank. *Annals of Surgery* 174.
- Boschetti, C., N. Pouchkina-Stantcheva, P. Hoffmann, and A. Tunnacliffe. 2010. Foreign genes and novel hydrophilic protein genes participate in the desiccation response of the bdelloid rotifer *Adineta ricciae*. *The Journal of Experimental Biology* 214:59-68.
- Boylen, C.W. 1973. Survival of *Arthrobacter crystallopoietes* during prolonged periods of extreme desiccation. *Journal of bacteriology*:33 - 37.
- Broadbent, J.R., and C. Lin. 1999. Effect of heat shock or cold shock treatment on the resistance of *Lactococcus lactis* to freezing and lyophilization. *Cryobiology* 39:88-102.

Bibliografía

- Browne, J.A., K.M. Dolan, T. Tyson, K. Goyal, A. Tunnacliffe, and A. Burnell. 2004. Dehydration-Specific induction of hydrophilic protein genes in the anhydrobiotic nematode *Aphelenchus avenae*. *Eukaryotic Cell* 3:966-975.
- Buchanan, S.S., D.W. Pyatt, and J.F. Carpenter. Preservation of differentiation and clonogenic potential of human hematopoietic stem and progenitor cells during lyophilization and ambient storage. *PLoS One* 5.
- Burch, G., and U. Sarathchandra. 2006. Activities and survival of endophytic bacteria in white clover (*Trifolium repens* L.). *Can J Microbiol* 52:848-56.
- Carpenter, J.F., and J.H. Crowe. 1989. An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry* 28:3916-22.
- Carpenter, J.F., B. Martin, L.M. Crowe, and J.H. Crowe. 1987. Stabilization of phosphofructokinase during air-drying with sugars and sugar/transition metal mixtures. *Criobiology* 24:455-464.
- Clegg, J.S. 2001. Cryptobiosis-a peculiar state of biological organization. *Comp Biochem Physiol* 128.
- Clegg, J.S. 2005. Desiccation tolerance in encysted embryos of the animal extremophile. *Artemia*. *Integr. Comp. Biol.* 45:714-724.
- Clegg, J.S., S.A. Jackson, and A.H. Warner. 1994. Extensive intracellular translocations of a major protein accompany anoxia in embryos of *Artemia franciscana*. *Exp. Cell Res.* 212:77-83.
- Conrad, P.B., D.P. Miller, P.R. Cielenski, and J.J. de Pablo. 2000. Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. *Cryobiology* 41:17-24.
- Cordone, L., G. Cottone, and S. Giuffrida. 2007. Role of residual water hydrogen bonding in sugar/water/biomolecule systems: a possible explanation for *trehalose peculiarity*. *J. Phys. Condens Matter* 19:16pp.
- Corredoira, E., D. Montenegro, M.C. San-Jose, A.M. Vieitez, and A. Ballester. 2004. Agrobacterium-mediated transformation of European chestnut embryogenic cultures. *Plant Cell Rep* 23:311-8.
- Crowe, J.H., J.F. Carpenter, and L.M. Crowe. 1998. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 60:73-103.
- Crowe, J.H., L.M. Crowe, J.F. Carpenter, and C. Aurell Wistrom. 1987. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem J* 242:1-10.
- Crowe, J.H., L.M. Crowe, A.E. Oliver, N. Tsvetkova, W. Wolkers, and F. Tablin. 2005. the trehalose Myth revisited: Introduction to a symposium on stabilization of cells in the Dry State 1. *Cryobiology* 43:89-105.
- Crowe, J.H., and L.M. Crowe. 1986. Stabilization of membranes in anhydrobiotic organisms. In aA.C. Leopold (ed).
- Crowe, J.H., and L.M. Crowe. 1992a. Anhydrobiosis: a strategy for survival. *Adv Space Res* 12:239-247.
- Crowe, J.H., and L.M. Crowe. 1992b. Membrane integrity in anhydrobiotic organisms: toward a mechanism for stabilizing dry cells:87-103.
- Crowe, L.M. 2002. Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis* 1. *Comparative Biochemistry and physiology-PartA: Molecular & Integrative Physiology* 131:505-513.
- Crowe, L.M., and J.H. Crowe. 1992. Anhydrobiosis: a strategy for survival. *Advances in Space Research* 12:239-247.
- Chakrabortee, S., R. Tripathi, M. Watson, G.S.K. Schierle, D.P. Kurniawan, C.F. Kaminski, M.J. Wise, and A. Tunnacliffe. 2012. Intrinsically disordered proteins as molecular shields. *Mol. BioSyst.* 8:210-219.

Bibliografía

- Chang, W.S., M. van de Mortel, L. Nielsen, G. Nino de Guzman, X. Li, and L.J. Halverson. 2007. Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under waterlimiting conditions. *Journal of Bacteriology* 189:8290-8299.
- Chaplin, M.F. 2001. Water: its importance to life. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 29:54-59.
- Chernyadev, I.I. 2009. The protective action of cytokinins on the photosynthetic machinery and productivity of plants under stress. *Appl. Biochem. Microbiol.* 45:351-362.
- Chmielarz, P., G. Grenier-de March, and M.T. Boucaud. 2005. Cryopreservation of *Quercus robur* L. embryogenic calli. *Cryo Letters* 26:349-56.
- Daly, M.J., E.K. Gaidamakova, V.Y. Matrosova, A. Vasilenko, M. Zhai, A. Venkateswaran, M. Hess, M.V. Omelchenko, H.M. Kostandarithes, and K.S. Makarova. 2004. Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance. *Science* 306:1025-1028.
- Daly, M.J., E.K. Gaidamakova, V.Y. Matrosova, a. Vasilenko, M. Zhai, R.D. Leapman, B. Lai, B. Ravel, S.M.W. Li, K.M. Kemmer, and J.K. Fredickson. 2007. Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance. *PLoS Biol* 5:92.
- Davies, W.J., and J. Zhang. 1991. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 42:55-76.
- de Castro, A.G., J. Lapinski, and A. Tunnacliffe. 2000. Anhydrobiotic engineering. *Nat Biotechnol* 18:473.
- de Winder, B.m., H.C.P.; and Mur, L.R. 1990. The role of water retaining substrata on the photosynthetic response of three drought tolerant phototrophic microorganisms isolated from a terrestrail habitat. *Arch Microbiol* 152:458 - 462.
- Deikman, J. 1997. Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene transcription. *Physiol Plant* 100:561-566.
- Di Bonaventura, G., R. Piccolomini, R. Palaudi, V. D'Orio, A. Vergara, M. Conter, and A. Ianieri. 2008. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology* 104:1552-1561.
- Djordjevic, D., M. Wiedmann, and L.A. McLandsborough. 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology* 68:2950-2958.
- do Carmo, F.L., H.F. dos Santos, E.F. Martins, J.D. van Elsas, A.S. Rosado, and R.S. Peixoto. Bacterial structure and characterization of plant growth promoting and oil degrading bacteria from the rhizospheres of mangrove plants. *J Microbiol* 49:535-43.
- Dorward, D.W., and C.F. Garon. 1990. DNA is packaged within membrane-derived vesicles of gram-negative but not gram positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1960-1962.
- Egamberdieva, D., F. Kamilova, S. Validov, L. Gafurova, Z. Kucharova, and B. Lugtenberg. 2008. High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. *Environ Microbiol* 10:1-9.
- Eichner, K., and M. Ciner-Doruk. 1981. Formation and decomposition of browning intermediates and visible sugar-amine browning reactions. *Water activity:*

Bibliografía

- influences on food quality; Rockland, L.B., Stewart, G.F. Eds; Academic Press: Oxford 4:432-445.
- Ernst, A., T.-W. Chen, and P. Böger. 1987. Carbohydrate formation in rewetted terrestrial cyanobacteria. *Oecologia* (Berlin) 72:574-576.
- Eroglu, A., M.J. Russo, R. Bieganski, A. Fowler, S. Cheley, H. Bayley, and M. Toner. 2000. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nat Biotechnol* 18:163-7.
- Ertugrul, S., G. Donmez, and T. S. 2007. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *J Hazard Mater* 149:720-724.
- Fahy, G.M., B. Wowk, J. Wu, J. Phan, C. Rasch, A. Chang, and E. Zendejas. 2004. Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances. *Cryobiology* 48:157-78.
- Farwell, A.J., S. Vesely, V. Nero, H. Rodríguez, K. McCormack, S.I. Shah, D.G. Dixon, and B.R. Glick. 2008. Tolerance of transgenic canola plants (*Brassica napus*) amended with plant growth-promoting bacteria to flooding stress at a metal-contaminated field site. *J Microbiol Biotechnol* 18:958-63.
- Feder, M.E., and G.E. Hofmann. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Ann. Rev. Physiol.* 61:243-282.
- Fernandes, P., E. Rodriguez, G. Pinto, I. Roldan-Ruiz, M. De Loose, and C. Santos. 2008. Cryopreservation of *Quercus suber* somatic embryos by encapsulation-dehydration and evaluation of genetic stability. *Tree Physiol* 28:1841-50.
- Figueiredo, V.B. 2008. Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. *Appl. Soil. Ecol.* 40:182-188.
- Finkel, S.E., and R. Kolter. 2001. DNA as a nutrient: novel role for bacterial competence gene homologs. *J Bacteriol* 183:6288-6293.
- Garay-Arroyo, A., J.M. comenero-Flores, A. Garciarrubio, and A.A. Covarrubias. 2000. Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *J. Biol. Chem.* 275:5668-5674.
- Garcia-Perez, A., and M.B. Burg. 1991. Role of organic osmolytes in adaptation of renal cells to high osmolality. *Journal of Membrane Biology* 119:1-13.
- Garcia De Castro, A., H. Bredholt, A.R. Strom, and A. Tunnacliffe. 2000. Anhydrobiotic engineering of gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol* 66:4142-4.
- Gilichinsky, D.A., Vorobyova, E.A., Erokhina, L.G., Fyodorov-Dayvdov, D.G., and Chaikvskaya, N.R. 1992. Long-term preservation of microbial ecosystems in permafrost. *Adv Space Res* 12:255 -263.
- Glickmann, E., and Y. Dessaux. 1995. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 61:793-6.
- Goh, F., Y.J. Jeon, K. Barrow, B.A. Neilan, and B.P. Burns. 2011. Osmoadaptive strategies of the archaeon *Halococcus hamelinensis* isolated from a hypersaline stromatolite environment. Goh, F.
- Goldman, E., and L.H. Green. 2009. Practical handbook of microbiology. Second Edition ed. CRC, USA.
- Golovina, E.A., A.V. Golovin, F.A. Hoekstra, and R. Faller. 2009. Water replacement hypothesis in atomic detail--factors determining the structure of dehydrated bilayer stacks. *Biophys J* 97:490-9.

Bibliografía

- Goude, R., S. Renaud, S. Bonnassie, T. Bernard, and C. Blanco. 2004. Glutamine, glutamate, and alpha-glucosylglycerate are the major osmotic solutes accumulated by *Erwinia chrysanthemi* strain 3927. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:6535-41.
- Goyal, K., L.J. Walton, and A. Tunnacliffe. 2005. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem J* 388:151-7.
- Granada, A.d. 2001. Plan General de Ordenación Urbana. <http://www.granada.org/inet/wpgo.nsf/8c6283f8cc03dea2c1256e32003da6e9/a68929199ffeee89c1256e27007baf9d!OpenDocument> (11/02/2012).
- Guibert, E.E., A.Y. Petrenko, C.L. Balaban, A.Y. Somov, J.V. Rodriguez, and B.J. Fuller. 2011. Organ Preservation: Current Concepts and New Strategies for the Next Decade. *Transfus Med Hemother* 38:125-142.
- Hajare, A., S. Pisal, and H. More. 2009. Vacuum foam drying: a new technology for preservation of sensitive biomolecules. *Eur. Industrial Pharmacy* 2:16-18.
- Hall-Stoodley, L., L. Nistico, K. Sambanthamoorthy, B. Dice, D. Nguyen, W.J. Mershon, C. Johnson, and F.Z. Hu. 2008. Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *BMC Microbiol* 8:173-189.
- Hamilton, H.I., N.M. Dominguez, K.J. Schwartz, K.T. Hackeet, and J.P. Dillard. 2005. *Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. *Mol Microbiol* 55:1704-1721.
- Han, Y., G.B. Quan, X.Z. Liu, E.P. Ma, A. Liu, P. Jin, and W. Cao. 2005. Improved preservation of human red blood cells by lyophilization. *Cryobiology* 51:152-64.
- Hand, S.C., M.A. Menze, M. Toner, L. Boswell, and D. Moore. 2011. LEA proteins during water stress: not just for plants anymore. *Annual Review of Physiology.* 73:115-134.
- Hansen, L.T., and B.F. Vogel. 2011. Desiccation of adhering and biofilm *Listeria monocytogenes* on stainless steel: survival and transfer to salmon products. *International Journal of Food Microbiology* 146:88-93.
- Harmsen, M., M. Lappann, S. Knochel, and S. Molin. 2010. Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 76:2271-9.
- Hengherr, S., A.G. Heyer, H.R. Kohler, and R.O. Schill. 2008. Trehalose and anhydrobiosis in tardigrades-evidence for divergence in responses to dehydration. *FEBS J* 275:281-288.
- Hengherr, S., A.G. Heyer, F. Brummer, and R.O. Schill. 2011. Trehalose and vitreous states: desiccation tolerance of dormant stages of the crustaceans *Triops* and *Daphnia*. *Physiol Biochem Zool* 84:147-153.
- Hershkovitz, N., A. Oren, and Y. Cohen. 1991. Accumulation of trehalose and sucrose in cyanobacteria exposed to matrix water stress. *Applied and Environmental Microbiology* 57:645.
- Hill, D.R., T.W. Keenan, R.F. Helm, M. Potts, L.M. Crowe, and J.H. Crowe. 1997. Extracellular polysaccharide of *Nostoc commune* (Cyanobacteria) inhibits fusion of membrane vesicles during desiccation. *Journal of Applied Phycology* 9:237-248.
- Hincha, D.K., E. Zuther, and A.G. Heyer. 2003. The preservation of liposomes by raffinose family oligosaccharides during drying is mediated by effects on fusion and lipid phase transitions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*:172-177.

Bibliografía

- Hoekstra, F.A., E.A. Golovina, and J. Buitink. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci* 6:431-438.
- Huang, X.D., D.M. Penrose, B.R. Glick, and M.B. Greenberg. 2004. A multiprocess phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Environ Pollut* 130:465-476.
- Hubalek, Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* 46:205-29.
- Illing, H., K.J. Denby, H. Collett, A. Shen, and J.N. Farrant. 2005. The signature of seeds in resurrection plants: a molecular and physiological comparison of desiccation tolerance in seeds and vegetative tissues. *Integrative and Comparative Biology* 45:771-787.
- Israeli, E., B.T. Shaffer, and B. Lighthart. 1993. Protection of freeze-dried *Escherichia coli* by trehalose upon exposure to environmental conditions. *Cryobiology* 30:519-23.
- Iturriaga, G., D. Gaff, and R. Zentella. 2000. New desiccation-tolerant plants, including a grass, in the central highlands of Mexico, accumulate trehalose. *Australian Journal of Botany* 48:153-158.
- Itzek, A., L. Zheng, Z. Chen, J. Merrit, and J. Kreth. 2011. Hydrogen peroxide-dependent DNA release and transfer of antibiotic resistance genes in *Streptococcus gordonii*. *Journal of bacteriology* 193:6912-6922.
- Izano, E.A., M.A. Amarante, W.B. Kher, and J.B. Kaplan. 2008. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 74:470-476.
- Jaleel, C.A., P. Manivannan, B. Sankar, A. Kishorekumar, R. Gopi, R. Somasundaram, and R. Panneerselvam. 2007. *Pseudomonas fluorescens* enhances biomass yield and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* under water deficit stress. *Colloids Surf B Biointerfaces* 60:7-11.
- Jhonston, C.G., and R. Vestal. 1991. Photosynthetic carbon incorporation and turnover in Antarctic cryptoendolithic microbial communities: are they the slowest-growing communities on Earth? *Appl Environ Microbiol* 57:2308-2311.
- Jin, J.S., S.O. Kwon, and D.C. Moon. 2011. *Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein a via outer membrane vesicles. *PLoS One* 6.
- Jovanovich, S.B., M.T. Record, and R.R. Burgess. 1989. In a *Escherichia coli* coupled transcription-translation system, expression of the osmoregulated gene *proU* is stimulated at elevated potassium concentrations and by an extract from cells grown at high osmolality. *J Biol Chem* 264:7821-5.
- Kamala-Kannan, S., K.J. Lee, S.M. Park, J.C. Chae, B.S. Yun, Y.H. Lee, Y.J. Park, and B.T. Oh. 2010. Characterization of ACC deaminase gene in *Pseudomonas entomophila* strain PS-PJH isolated from the rhizosphere soil. *J Basic Microbiol* 50:200-5.
- Keilin, D. 1959. The problem of anabiosis or latent life: history and current concept. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 150:149-191.
- Kempf, B., and E. Bremer. 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of Microbiology* 170:319-330.
- Kikawada, T., A. Saito, Y. Kanamori, Y. Nakahara, K. Iwata, D. Tanaka, M. Watanabe, and T. Okuda. 2007. Trehalose transporter 1, a facilitated and high-capacity trehalose transporter, allows exogenous trehalose uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:11585-90.

Bibliografía

- Klähn, S., and M. Hagemann. 2011. Compatible solute biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental Microbiology* 13:551-562.
- Koo, S.Y., and K.S. Cho. 2009. Isolation and characterization of a plant growth-promoting rhizobacterium, *Serratia* sp. SY5. *J Microbiol Biotechnol* 19:1431-8.
- Koster, K.L., K.J. Maddocks, and G. Bryant. 2003. Exclusion of maltodextrins from phosphatidylcholine multilayers during dehydration: effects on membrane phase behaviour. *Eur. Biophys. J.* 32:96-105.
- Kranner, I., and S. Birtic. 2005. A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. *Integr. Comp. Biol* 45:734-740.
- Kucey RMN, J.H., and Leggett ME,. 1989. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Adv. Agron* 42:199-228.
- Kumar, K.V., S. Srivastava, N. Singh, and H.M. Behl. 2009. Role of metal resistant plant growth promoting bacteria in ameliorating fly ash to the growth of *Brassica juncea*. *J Hazard Mater* 170:51-57.
- Kurunczi, A., E. Bolzani, H.M. Wilhelm, and L. Pereira. 2008. Optimization of the ethanolysis of *Raphanus sativus* (L. Var.) crude oil applying the response surface methodology. *Bioresource Technology* 99:1837-1845.
- Kwak, E.J., and S.I. Lim. 2004. The effect of sugar, amino acid, metal ion, and NaCl on model Maillard reaction under pH control. *Amino Acids* 27:85-90.
- Kwon, S.O., Y.S. Gho, J.C. Lee, and S.I. Kim. 2009. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. *FEMS Microbiol Letters* 297:150-156.
- LeBlanc, J.C.G., Edmilton R.: Mohn, William W. 2008. Global response to desiccation stress in the soil actinomycete *Rhodococcus jostii* RHA1. *Appl Environ Microbiol*:2627 - 2636.
- Lee, J.S., K.C. Lee, Y.R. Piun, and K.S. Bae. 2003. *Arthrobacter koreensis* sp nov a novel alkalitolerant bacterium from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53:1277-1280.
- Lee, S., M. Flores-Encarnación, M. Contreras-Zentella, L. García-Flores, J.E. Escamilla, and C. Kennedy. 2004. Indole-2-acetic acid biosynthesis is deficient in *Glucanacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. *J Bacteriol* 186:5384-5391.
- Legault, G.S., S. Lerat, P. Nicolas, and C. Beaulieu. 2011. Tryptophan regulates thaxtomin A and indole-3-acetic acid production in *Streptomyces scabiei* and modifies its interactions with radish seedlings. *Phytopathology* 101:1045-51.
- Lenne, T., G. Bryant, C.J. Garvey, U. Keiderling, and K.L. Koster. 2006. Location of sugars in multilamellar membranes at low hydration. *Physica B (Amsterdam)* 385-386:862-864.
- Lentzen, G., and T. Schwarz. 2005. Kompatible solute: Mikrobielle Herstellung und Anwendung. In: Anthranikian G (ed) *Angewandte Mikrobiologie*. Springer, Berlin Heidelberg New York:335-372.
- Leslie, S.B., S.A. Teter, L.M. Crowe, and J.H. Crowe. 1994. Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yeast cells. *Biochim Biophys Acta* 1192:7-13.
- Leveau, J.H., and S.E. Lindow. 2005. Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. *Appl Environ Microbiol* 71:2365-71.
- Li, W., H.L. Liu, and Q. Xu. 2012. Extracellular Dextran and DNA affect the formation of *Enterococcus faecalis* biofilms and their susceptibility to 2% chlorhexidine. *JOE* 38:894-898.

Bibliografía

- Liang, P., R. Amons, J.S. Clegg, and T.H. Mac Rae. 1997. Molecular characterization of a small heat shock/alpha-crystallin protein in encysted *Artemia* embryos. *J. Biol. Chem.* 272:19051-19058.
- Lin, L., W. Guo, Y. Xing, X. Zhang, Z. Li, C. Hu, S. Li, Y. Li, and Q. An. 2012. The actinobacterium *Microbacterium* sp. 16H accepts pBBR1-based pROBE vectors, forms biofilms, invades roots, and fixes N₂ associated with micropropagated sugarcane plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93:1185-95.
- Lipton, D.S., R.W. Blanchar, and D.G. Blevins. 1987. Biocontrol of plant pathogens: principles, promises and pitfalls. In "The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant intervade" ed. R. PInton, Z. Varanini, P. Nannipieri. Boca Ratón, FL: CRC Press/Taylor & Francis Group. 2nd ed:267-96.
- Loi, P., K. Matsukawa, G. Ptak, M. Clinton, J. Fulka, Jr., Y. Nathan, and A. Arav. 2008. Freeze-dried somatic cells direct embryonic development after nuclear transfer. *PLoS One* 3:e2978.
- Lopez-Bucio, J., J.C. Campos-Cuevas, E. Hernandez-Calderon, C. Velasquez-Becerra, R. Farias-Rodriguez, L.I. Macias-Rodriguez, and E. Valencia-Cantero. 2007. *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin-and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* 20:207-217.
- Lovelock, J., and C. Polge. 1954. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. *Biochemical Journal* 58:618.
- Lugtemberg, B., and F. Kamilova. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63:541-56.
- Ma, B., Y. He, H.H. Cen, J.M. Xu, and Z. Rengel. 2010. Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the rhizosphere: synthesis through metanalysis. *Environmental Pollution* 158:855-861.
- Ma, X., K. Jamil, T.H. Macrae, J.S. Clegg, J.M. Russell, T.S. Villeneuve, M. Euloth, Y. Sun, J.H. Crowe, F. Tablin, and A.E. Oliver. 2005. A small stress protein acts synergistically with trehalose to confer desiccation tolerance on mammalian cells. *Cryobiology* 51:15-28.
- Mabrouki, K., J.M. Rodríguez-Maroto, and J.J. San Julián-Cruz. 2001. Retención del amonio durante el riego de un suelo de la Vega de Granada con aguas residuales. V Jornadas sobre investigación en Zona No Saturada. Pamplona. España. Eds López M. Quemada.
- MacMillan, J. 2002. Ocurrance of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. *J Plant Growth Regul* 20:387-442.
- Magan, N. 2008. Ecophysiology: Impact of environment on growth, synthesis of compatible solutes and enzyme production. Elsevier:63-78.
- Mandal, S.M., M. Mandal, A.K. Das, B.R. Pati, and A.K. Ghosh. 2009. Stimulation of indoleacetic acid production in a *Rhizobium* isolate of *Vigna mungo* by root nodule phenolic acids. *Arch Microbiol* 191:389-93.
- Manzanera, M., S. Vilchez, and A. Tunnacliffe. 2004a. Plastic encapsulation of stabilized *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Appl . Environ. Microbiol.* 70:3143-3145.
- Manzanera, M., S. Vilchez, and A. Tunnacliffe. 2004b. High survival and stability rates of *Escherichia coli* dried in hydroxyectoine. *FEMS Microbiol Lett* 233:347-52.
- Manzanera, M., S. Vilchez, and A. Tunnacliffe. 2004c. Plastic encapsulation of stabilized *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* 70:3143-5.

Bibliografía

- Manzanera, M., A. Garcia de Castro, A. Tondervik, M. Rayner-Brandes, A.R. Strom, and A. Tunnacliffe. 2002. Hydroxyectoine is superior to trehalose for anhydrobiotic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Environ Microbiol* 68:4328-33.
- Manzanera, M., J.J. Narváez-Reinaldo, L. SantaCruz-Calvo, J.I. Vílchez, J. González-López, and C. Calvo. 2010. New isolation method of desiccation-tolerant microorganisms for the bioremediation of arid and semiarid soils. Popov V., Brevia CA (eds) *Environmental toxicology III*. Wessex Institute of technology, Southampton:121-130.
- Manzanera, M., García de Castro A., Tondervik A, Rayner-Brandes M, Strom AR, Tunnacliffe A. 2002. Hydroxyectoine is superior to trehalose for anhydrobiotic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Environ Microbiol* 68:4328-4333.
- Martínez-Gil, F.J. 2006. Las sequías en España, un fenómeno recurrente. Congreso homenaje al duero y sus ríos: memoria, cultura y porvenir (26, 27, 28 y 29 de abril de 2006).
- Mayak, S., T. Tirosh, and B.R. Glick. 2004a. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiol Biochem* 42:565-72.
- Mayak, S., T. Tirosh, and B.R. Glick. 2004b. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Science* 166:525-530.
- Mayz-Figueroa, J. 2004. Fijación biológica de nitrógeno. *Revista USDO Agrícola* 4:20.
- Maz, M., and A.A. Chowdhury. 1984. Microbial mineralization of organic phosphate in soil. *Plant Soil* 78:393-399.
- McDonnell, G., and A.D. Russell. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 12:147-79.
- Melissa, M.A., and K.D. Schneider. 2006. Plant and microbial based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. *Anais da academia brasileira de ciências* 78:791-807.
- Menze, M.A., and S.C. Hand. 2009. How do animal mitochondria tolerate water stress? *Commun. Integr. Biol.* 2:428-430.
- Miller, D.P., R.E. Anderson, and J.J. de Pablo. 1998. Stabilization of lactate dehydrogenase following freeze thawing and vacuum-drying in the presence of trehalose and borate. *Pharm Res* 15:1215-21.
- Molin, S.a.T.-N., T. 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilization of the biofilm structure. *Curr Opin Biotechnol* 14:255-261.
- Molina, C.A., J.F. Cana-Roca, A. Osuna, and S. Vilchez. 2010. Selection of a *Bacillus pumilus* strain highly active against *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) larvae. *Appl Environ Microbiol* 76:1320-7.
- Morais, P.V.C., Paulo; Francisco, Romeu; Branco, Rita; Chung, Ana Paula; da Costa, Milton S. 2005. *Leucobacter luti* sp. nov., and *Leucobacter alluvii* sp. nov., two new species of the genus *Leucobacter* isolated under chromium stress. *Systematic and applied microbiology*:414 - 421.
- Morgan, C.A., N. Herman, P.A. White, and G. Vesey. 2006. Preservation of microorganisms by drying; a review. *J Microbiol Methods* 66:183-193.
- Mulcahy, H., L. Charron-Mazenod, and S. Lewenza. 2010. *Pseudomonas aeruginosa* produces an extracellular deoxyribonuclease that is required for utilization of DNA as a nutrient source. *Environ Microbiol* 12:1261-1269.

Bibliografía

- Mullen, S.F., and J.K. Critser. 2007. The science of cryobiology. *Oncofertility Fertility Preservation for Cancer Survivors*:83-109.
- Naganandini, S., D. Balachandar, and K. Kumar. 2011. Diversity analysis of pseudomonas in rice rhizosphere for multifaceted plant growth promotion. *Acta Microbiol Immunol Hung* 58:247-58.
- Nakahara, Y., S. Imanishi, K. Mitsumasu, Y. Kanamori, K. Iwata, M. Watanabe, T. Kikawada, and T. Okuda. 2010. Cells from an anhydrobiotic chironomid survive almost complete desiccation. *Cryobiology* 60:138-46.
- Narvaez-Reinaldo, J.J., I. Barba, J. Gonzalez-Lopez, A. Tunnacliffe, and M. Manzanera. 2010. Rapid method for isolation of desiccation-tolerant strains and xeroprotectants. *Appl Environ Microbiol* 76:5254-62.
- Narváez-Reinaldo, J.J., J.I. Víchez, A. Oliver-Jacobo, L. SantaCruz-Calvo, R. Picazo-Espinosa, J. González-López, and M. Manzanera. 2010. <<Plant Growth Promoting Rhizobacteria for protection against drought>> XIII National Meeting of the Spanish Society of Nitrogen Fixation. II Portuguese-Spanish Congress on Nitrogen Fixation. , Zaragoza.
- Nelson, K.E., C. Weinel, I.T. Paulsen, R.J. Dodson, H. Hilbert, V.A. Martins dos Santos, D.E. Fouts, S.R. Gill, M. Pop, M. Holmes, L. Brinkac, M. Beanan, R.T. DeBoy, S. Daugherty, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, O. White, J. Peterson, H. Khouri, I. Hance, P. Chris Lee, E. Holtzapple, D. Scanlan, K. Tran, A. Moazzez, T. Utterback, M. Rizzo, K. Lee, D. Kosack, D. Moestl, H. Wedler, J. Lauber, D. Stjepandic, J. Hoheisel, M. Straetz, S. Heim, C. Kiewitz, J.A. Eisen, K.N. Timmis, A. Dusterhoft, B. Tumber, and C.M. Fraser. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* 4:799-808.
- Nelson, L.M. 2004. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants. Online. Crop Management, Plant Management Network.
- Nursten, H.E. 1980. Recent developments in studies of the Maillard reaction. *Food Chemistry* 6:263-277.
- Omar, S.A. 1998. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular-arbuscular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. *World J Microbiol Biotechnol* 14:211-218.
- Ortega-Morales, B.O.S.-G., J.L.; Chan-Bacab, M.J.; Moppert X.; Miranda-Tello, E.; Fardeau M.L.; Carrero, J.c.; Bartolo-Pérez, P.; Valadéz-González, A.; and Guezennec, J. 2006. Characterization of extracellular polymers synthesized by tropical intertidal biofilm bacteria. *Journal of Applied Microbiology*:254 - 264.
- Ortega-Morales, O.L.-C., A.; Hernández-Duque, G.; Crassous, P.; and Guezennec, J. 2001. Extracellular polymers of microbial communities colonizing limestone surfaces. *Methods Enzymol* 336.
- Pan, Y., F. Breidt, and L. Gorski. 2010. Synergistic effect of sodium chloride, glucose, and temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains. *Applied and Environmental Microbiology* 76:1433-1441.
- Papendick, R.I., and G.S. Campbell. 1981. Theory and measurement of water potential. In J.F. Parr, W. R. gardner, and L.F. Elliot (ed.), *Water potential relations in soil microbiology*. Soil Science Society of America, madison, Wis.:1-22.
- Parsell, D.A., and S. Lindquist. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27:437-496.
- Pearson, W.R., and D.J. Lipman. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:2444-8.

Bibliografía

- Pegg, d.E. 2007. Principles of cryopreservation. *Methods in Molecular Biology-Clifton Then Totowa* 368.
- Penrose, D.M., and B.R. Glick. 2001. Levels of ACC and related compounds in exudate and extracts of canola seeds treated with ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Can J Microbiol* 47:368-72.
- Pospisilova, J., and P. Batkova. 2004. Effects of pre-treatments with abscisic acid and/or benzyladenine on gas exchange of French bean, sugar beet, and maize leaves during water stress and after rehydration. *Biol. Plant* 48:395-399.
- Potts, M. 1994a. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev* 58:755-805.
- Potts, M. 1994b. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev* 58:755-805.
- Potts, M. 2001. Desiccation tolerance: a simple process? *TRENDS in microbiology* 9:553-559.
- Potts, M. Unpublished data.
- Potts, M., S.M. Slaughter, F. Hunneke, J.F. Garst, and R.F. Helm. 2005. Desiccation tolerance of prokaryotes: applications of principles to human cells. *Integr. Comp. Biol* 45:800-809.
- Praveen, K.S., S.I. Pavithra, M.O. Amrita, R.P. Karishma, and A.C. Balu. 2012. Characterization of eDNA from the clinical strain *Acinetobacter baumannii* AIIMS7 and its role in biofilm formation. *The Sicientific World Journal*:1-10.
- Raschke, T.M. 2006. Water structure and interactions with protein surfaces. *Current Opinon in Structural Biology* 16:152-159.
- Rebecchi, L., T. Altiero, and R. Guidetti. 2007. Anhydrobiosis: the extreme limit of desiccation tolerance. *Invertebr Surv J.* 65:661-671.
- Renelli, M., V. Matias, R.Y. Lo, and T.J. Beveridge. 2004. DNA containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology* 150:2161-2169.
- Reyes, J.L., M.J. Rodrigo, J.M. Comenero-Flores, J.V. Gil, A. Garay-Arroyo, F. Campos, F. Salamini, and D. Bartels. 2005. Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. *Plant Cell Environ* 28:709-718.
- Ribeiro, C.M., and E.J. Cardoso. 2012. Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). *Microbiol Res.* 167:69-78.
- Rice, K.C. 2007. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:81138118.
- Rincon, A., F. Valladares, T.E. Gimeno, and J.J. Pueyo. 2008. Water stress responses of two Mediterranean tree species influenced by native soil microorganisms and inoculation with a plant growth promoting rhizobacterium. *Tree Physiol* 28:1693-701.
- Ritter, D., and J.H. Yopp. 1993. Plasma membrane lipid composition of the halophilic cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Arch. Microbiol* 159:435-439.
- Rizzo, A.M., M. Negroni, T. Altiero, G. Montorfano, P. Corsetto, P. Berselli, B. Berra, R. Guidetti, and L. Rebecchi. 2010. Antioxidant defences in hydrated and desiccated states of the tardigrade *Paramacrobiotus richtersi*. *Comp Biochem Physiol* 156B:115-121.
- Rodriguez, H., and R. Fraga. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv* 17:319-339.

Bibliografía

- Romano, I., L. Lama, P. Orlando, B. Nicolaus, A. Giordano, and A. Gambacorta. 2007. *Halomonas sinaiensis* sp. nov., a novel halophilic bacterium isolated from a salt lake inside Ras Muhammad Park, Egypt. *Extremophiles* 11:789-96.
- Römheld, V., and H. Marschner. 1986. Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. *Plant Physiol* 80:175-180.
- Rudolph, A.S., J.H. Crowe, and L.M. Crowe. 1986. Effects of three stabilizing agents--proline, betaine, and trehalose--on membrane phospholipids. *Arch Biochem Biophys* 245:134-43.
- Russell, A.D. 1990. Bacterial spores and chemical sporicidal agents. *Clin. Microbiol. Rev* 3:99-119.
- Sagot, B., M. Gaysinski, M. Mehiri, J.M. Guignon, D. Le Rudulier, and G. Alloing. 2010. Osmotically induced synthesis of the dipeptide N-acetylglutaminylglutamine amide is mediated by a new pathway conserved among bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:12652-7.
- Sahu, P., P.S. Iyer, A.M. Oak, K.R. Parsdesi, and B.A. Chopade. 2011. Characterization of eDNA from the clinical strain *Acinetobacter baumannii* AIIMS7 and its role in biofilm formation. *The Scientific World Journal* 12.
- Sakane, L., Rubin R.L., and Levin E.G. 1993. Long-term preservation of halophilic archaeobacteria and thermoacidophilic archaeobacteria by liquid drying. *J.Microbiol.* 16:281 - 287.
- Saleem, M., M. Arshad, S. Hussain, and B. Ass. 2007. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J. Ind Microbiol Biotechnol* 34:635-648.
- Sambrook, J., and D.W. Russell. 2001. Spectrophotometry of DNA or RNA. In *molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 3 (3^a ed):8.20-8.21.
- Sandine, W.E. 1996. Commercial production of diary starter cultures. In "Diary Starter Cultures" (T.M. Cogan and J.-P. Accolas, Eds). VCH, New York:191-206.
- Sauer, T., and E.A. Galinski. 1998. Bacterial milking: A novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnol Bioeng* 59:128.
- Saum, S., and V. Müller. 2007. Salinity-dependent switching of osmolyte strategies in a moderately halophilic bacterium: glutamate induces proline biosynthesis in *Halobacillus halophilus*. *J Bacteriol* 189:6968-75.
- Saum, S., F. Pfeiffer, P. Palm, M. Rampp, S. Schuster, V. Müller, and D. Oesterhelt. 2012. Chloride and organic osmolytes: a hybrid strategy to cope with elevated salinities by the moderately halophilic, chloride-dependent bacterium *Halobacillus halophilus*. *Environ Microbiol.*
- Schwachtje, J., S. Karojet, S. Kunz, S. Brouwer, and J.T. van Dongen. 2012. Plant-growth promoting effect of newly isolated rhizobacteria varies between two *Arabidopsis* ecotypes. *Plant Signal Behav* 7.
- Schwarz, G.L.a.T. 2006. Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:623-634.
- Secundo, F., and G. Carrea. 2005. Mono- and disaccharides enhance the activity and enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* lipase in organic solvent but do not significantly affect its conformation. *Biotechnol Bioeng* 92:438-46.
- Secundo, F., C. Russo, A. Giordano, G. Carrea, M. Rossi, and C.A. Raia. 2005. Temperature-induced conformational change at the catalytic site of *Sulfolobus solfataricus* alcohol dehydrogenase highlighted by Asn249Tyr substitution. A hydrogen/deuterium exchange, kinetic, and fluorescence quenching study. *Biochemistry* 44:11040-8.

Bibliografía

- Siegele, D.A., and R. Kolter. 1992. Life after log. *J Bacteriol* 174:345-8.
- Sipilä, T.P., A.K. Keskinen, M.L. Akerman, C. Fortelius, K. Haahtela, and K. Yrjölä. 2008. High aromatic ring-cleavage diversity in birch rhizosphere: PAH treatment-specific changes of I.E.3 group extradiol dioxygenases and 16S rRNA bacterial communities in soil. *The ISME journal* 2:968-981.
- Sizeland, P.C.B., S.T. Chambers, M. Lever, L.M. Bason, and R.A. Robson. 1993. Organic osmolytes in human and other mammalian kidneys. *Kidney International* 43:448-448.
- Slade, D., and M. Radman. 2011. Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75:133-191.
- Slade, D., A.B. Lindner, G. Paul, and M. Radman. 2009. Recombination and replication in DNA repair of heavily irradiated *Deinococcus radiodurans*. *Cell* 136:1044-1055.
- Sneath, P.H.A. 1962. Longevity of micro-organisms. *Nature (London)* 195:643 - 646.
- Soto, G., L. Setten, C. Lisi, C. Maurelis, M. Mozzicafreddo, M. Cuccioloni, M. Angeletti, and N.D. Ayub. 2012. Hydroxybutyrate prevents protein aggregation in the halotolerant bacterium *Pseudomonas* sp CT13 under abiotic stress. *Extremophiles* 16:455-62.
- Spoering, A.L., and M.S. Gilmore. 2006. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Curr Opin Microbiol* 9:133-137.
- Stearns, J.C., O.Z. Woody, B.J. McConkey, and B.R. Glick. 2012. Effects of bacterial ACC deaminase on *Brassica napus* gene expression. *Mol Plant Microbe Interact* 25:668-76.
- Sudha, M., R.S. Gowri, P. Prabhavathi, P. Astapriya, S.Y. Devi, and A. Saranya. 2011. Production and optimization of indole acetic acid by indigenous micro flora using agro waste as substrate. *Pak J Biol Sci* 15:39-43.
- Sun, W.Q., and A.C. Leopold. 1997. Cytoplasmic vitrification and survival of anhydrobiotic organisms. *Comparative biochemistry and physiology part A.* 117:327-333.
- Tang, X.C., and M.J. Pikal. 2005. The effect of stabilizers and denaturants on the cold denaturation temperatures of proteins and implications for freeze-drying. *Pharm Res* 22:1167-75.
- Taylor, M.J., Y.C. Song, and K.G.M. Brockbank. 2004. Vitrification in tissue preservation: New developments. In: Fuller B., Lane, N. Benson E.E. (eds) *life in the Frozen State*, London, New York.
- Tompa, P. 2009. *Structure and functions of intrinsically disordered proteins*. Boca Raton, FL: Taylor and Francis.
- Tompa, P., C. Szasz, and L. Giday. 2005. Structural disorder throws new light on moonlighting. *Trends Biochem. Sci.* 30:484-489.
- Torres-Rubio, M.G., S.A. Valencia-Plata, J.V. Bernal-Castillo, and P. Martínez-Nieto. 2000. Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp producers of Indole-3-Acetic Acid and siderophores from colombian rice rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* 42:171-176.
- Trivedi, P., A. Pandey, and S. Tongmin. 2007. Chromate reducing and plant growth promoting activities of psychrotrophic *Rhodococcus erythropolis* MtCC 7905. *Journal of Basic Microbiology* 47:513-517.
- Tunnacliffe, A., and J. Lapinski. 2003. Resurrecting Van Leeuwenhoek's rotifers: a reappraisal of the role of disaccharides in anhydrobiosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:1755-71.

Bibliografía

- Tunnacliffe, A., and M.J. Wise. 2007. The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften* 94:791-812.
- Tunnacliffe, A., A. Garcia de Castro, and M. Manzanera. 2001. Anhydrobiotic engineering of bacterial and mammalian cells: is intracellular trehalose sufficient? *Cryobiology* 43:124-32.
- Tunnacliffe, A., D.K. Hinch, O. Leprince, and D. Macherel. 2010. LEA proteins: versatility of form and function. In *Dormancy and Resistance in Harsh Environments* (ed. E. Lubzens, H. Cerda and M.S Clarks). Berlin: Springer:91-108.
- Ugla, C., T. Moritz, G. Sandberg, and B. Sundberg. 1996. Auxin as a positional signal in pattern formation in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9282-6.
- Upadhyay, S.K., D.P. Singh, and R. Saikia. 2009. Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from rhizospheric soil of wheat under saline condition. *Curr Microbiol* 59:489-96.
- Ureta, A., and S. Nordlund. 2002. Evidence for conformational protection of nitrogenase against oxygen in *Gluconacetobacter diazotrophicus* by a putative FeSII protein. *J Bacteriol* 184:5805-5809.
- Vagenende, V., M.G. Yap, and B.L. Trout. 2009. Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry* 48:11084-96.
- Valladares, S., M. Toribio, C. Celestino, and A.M. Vieitez. 2004. Cryopreservation of embryogenic cultures from mature *Quercus suber* trees using vitrification. *Cryo Letters* 25:177-86.
- Vassilev, N., M. Vassileva, and I. Nicolaeva. 2006. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71:137-44.
- Verdoy, D., E. Marique, A.A. Covarrubias, M.R. de Felipe, and J.J. Puello. 2004. Differential organ-specific responses to salt stress and water deficit in nodulated bean. *Plant Cell Environ* 27:757-769.
- Verdoy D, L.M., Marique E, Covarrubias AA, de Felipe MR, Puello JJ 2004,. 2004. Differential organ-specific responses to salt stress and water deficit in nodulated bean. *Plant Cell Environ* 27:757-769.
- Verma, V.C., S.K. Singh, and S. Prakash. 2011. Bio-control and plant growth promotion potential of siderophore producing endophytic *Streptomyces* from *Azadirachta indica* A. Juss. *J Basic Microbiol* 51:550-6.
- Vilain, S., J.M. Pretorius, J. Theron, and V.S. Brözel. 2009. DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:2861-2868.
- Vilchez, J.I. 2010. Caracterización de la protección frente a la sequía por parte de una colección de microorganismos tolerantes a la desecación. *Trabajo de Investigación Tutelada para la obtención del título de Master oficial europeo en Investigación y Avances en Microbiología. Universidad de Granada.*
- Vilchez, J.I., A. Olivás, and M. Manzanera. comunicación personal. Caracterización de la protección frente a la sequía por parte de una colección de microorganismos tolerantes a la desecación. *Trabajo de Investigación Tutelada para la obtención del título de Master oficial europeo en Investigación y Avances en Microbiología. Universidad de Granada.*
- Vilchez, S., and M. Manzanera. 2011. Biotechnological uses of desiccation-tolerant microorganisms for the rhizoremediation of soils subjected to seasonal drought. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91:1297-1304.

Bibliografía

- Vilchez, S., A. Tunnacliffe, and M. Manzanera. 2008. Tolerance of plastic-encapsulated *Pseudomonas putida* KT2440 to chemical stress. *Extremophiles* 12:297-9.
- Vilchez S, T.A., Manzanera M,. 2008. Tolerance of plastic-encapsulated *Pseudomonas putida* KT2440 to chemical stress. *Extremophiles* 12:297-299.
- Vora, M.S., and H.N. Shelat. 1998. Impact of addition of different carbon and nitrogen sources on solubilization of rock phosphaaate by phosphate-solubilizing microorganisms. *Ind J Agr Sci* 68:292-294.
- Vreeland, R.H., Litchfield, C.D., Martin, E.L., Elliot, E. 1980. *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. *Int.J. Syst. Bacteriol* 30:485-495.
- Wakayama, T., and R. Yanagimachi. 1998. Fertilisability and developmental ability of mouse oocytes with reduced amounts of cytoplasm. *Zygote* 6:341-6.
- Walker, T.E., C.H. Han, V.H. Kollman, R.E. London, and N.A. Matwiyoff. 1982. ¹³C nuclear magnetic resonance studies of the biosynthesis by *Microbacterium ammoniaphilum* of L-glutamate selectively enriched with carbon-13. *J Biol Chem* 257:1189-95.
- Wang, W. 2000. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics* 203:1-60.
- Watanabe, M.K., T. and Okuda, T. . 2003. Increase of internal ion concentration triggers trehalose synthesis associated with cryptobiosis in larvae of *Polypedilum vanderplanki*. *Journal of Experimental Biology*, 206:2281-2286.
- Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier, and D.J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173:697-703.
- Westh, P., and H. Ramlov. 1991. Trehalose accumulation in the tardigrade *Adorybiotus coronifer* during anhydrobiosis. *Journal of Experimental Zoology* 258:303-311.
- Whitchurch, C.B., T. Toker-Nielsen, P.C. Ragas, and J.S. Mattick. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295:1487.
- Willsie, J.K., and J.S. Clegg. 2001. Nuclear p26, a small heat shock/alpha-crystallin protein, and its relationship to stress resistance in *Artemia franciscana* embryos. *J. Exp. Biol.* 204:2339-2350.
- Wolkers, W.F., H. Oldenhof, M. Alberda, and F.A. Hoekstra. 1998. A Fourier transform infrared microspectroscopy study of sugar glasses: application to anhydrobiotic higher plant cells. *Biochim Biophys Acta* 1379:83-96.
- Wolkers, W.F., N.J. Walker, F. Tablin, and J.H. Crowe. 2001. Human platelets loaded with trehalose survive freeze-drying. *Cryobiology* 42:79-87.
- Yabuuchi, E., L. Wang, M. Arakawa, and I. Yano. 1993. Survival of *Pseudomonas pseudomallei* strains at 5 degrees C. *Kansenshogaku Zasshi* 67:331-5.
- Yancey, P.H. 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high somolarity and other stresses. *Journal of Experimental Biology* 208:2819-2830.
- Yaron, S., G.L. Kolling, L. Simon, and K.R. Matthews. 2000. Vesicles mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66:4414-4420.
- Yi, H., and D.E. Crowley. 2007. Biostimulation of PAH degradation with plants containing high concentrations of linoleic acids. *Environ Sci Technol* 41:4382-4388.
- Zahir, Z.A., A. Munir, H.N. Asghar, B. Shararoon, and M. Arshad. 2008. Effectiveness of rhizobacteria containing ACC deaminase for growth promotion of peas (*Pisum sativum*) under drought conditions. *J Microbiol Biotechnol* 18:958-963.

Bibliografía

- Zahradka, K., D. Slade, A. Bailone, S. Sommer, D. Averbek, M. Petranovic, A.B. Lindner, and M. Radman. 2006. Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*. *Nature* 443:569-573.
- Zameer, F., S. Gopal, G. Krohne, and J. Kreft. 2010. Development of a biofilm model for *Listeria monocytogenes* EGD-e. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26:1143-1147.
- Zevenhuizen, L.P. 1992. Levels of trehalose and glycogen in *Arthrobacter globiformis* under conditions of nutrient starvation and osmotic stress. *Antonie Leeuwenhoek* 61:61 - 68.
- Zhang, H., A. Kallimanis, A. Koukou, and C. Drainas. 2004. Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils. *Appl Environ Biotechnol.* 65 (1):124-131.
- Zhang, J., J. Liu, L. Meng, Z. Ma, X. Tang, Y. Cao, and L. Sun. 2012. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat roots by wheat germ agglutinin labeled with fluorescein isothiocyanate. *J Microbiol.* 50:191-8.

