



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIÓLOGICAS**

**POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**



**INCREMENTO DE LA SUPERVIVENCIA DE *Pseudomonas putida* KT2440 A LA  
LIOFILIZACIÓN MEDIANTE EL USO DE UNA MEZCLA DE  
TREHALOSA / MYO-INOSITOL**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)  
CON OPCIÓN EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA**

**PRESENTA:**

**QFB. ELIZABETH ALONSO TORRES**

**ASESOR DE TESIS:**

**D.C. JESÚS MUÑOZ ROJAS**

**Co-ASESOR DE TESIS:**

**D.C. YOLANDA ELIZABETH MORALES GARCÍA**

**PUEBLA, PUE**

**ENERO, 2023**





Agradezco a CONACYT por la beca obtenida durante la maestría





## DEDICATORIA



A ti que me enseñas e impulsas a ser mejor en todos los aspectos de mi vida, gracias por todo.

Puede que el plan de vida cambie, pero eso no significa que podamos encontrar un nuevo camino





## A G R A D E C I M I E N T O S

Gracias a Dios por su inmenso amor, misericordia y las bendiciones que ha derramado en mi vida, te glorificaré para siempre.

Mi agradecimiento al D.C. Jesús Muñoz Rojas por darme la oportunidad de ser parte de su equipo, por compartir sus conocimientos, asimismo por la paciencia, la confianza que ha depositado en mí, por incitarme a superarme profesionalmente y al transmitirme el emprendimiento, usted es una de las personas a las que admiro.

Asimismo, doy gracias a la D.C. Yolanda Elizabeth Morales García por ayudar y apoyar a las correcciones de esta Tesis.

A mi comité revisor de Tesis por tener paciencia en la entrega de este trabajo, D.C. José Joaquín Alvarado Pulido, D.C. Luis Javier Martínez Morales, D.C. Luis Ernesto Fuentes Ramírez, D.C. Verónica Quintero Hernández y D.C. Antonino Báez Rogelio.

Finalmente, a mi madre por estar presente en mi vida.





## Índice

### Contenido

Índice .....	5
Índice de Gráficos .....	6
Índice de Tablas .....	6
Índice de ilustraciones .....	6
Resumen .....	7
Introducción .....	8
<b>Inoculantes bacterianos .....</b>	<b>9</b>
<i>Pseudomonas putida</i> <b>KT2440</b> .....	<b>11</b>
<b>Liofilización .....</b>	<b>12</b>
<b>Protectores .....</b>	<b>13</b>
Antecedentes .....	16
Justificación .....	19
Hipótesis .....	19
Objetivo general .....	20
Objetivos particulares .....	20
Materiales y Métodos .....	21
Medios de cultivo .....	21
Lioprotectores .....	21
Liofilización de <i>P. putida</i> <b>KT2440</b> .....	21
Determinación del número de células viables después de la liofilización. ....	22
Resultados .....	24
Determinación de la concentración trehalosa / myo-inositol con mayor tasa de supervivencia de <i>P. putida</i> <b>KT2440</b> . ....	24
Publicación de un artículo de revisión abarcando temas sobre la tolerancia a la desecación de <i>P. putida</i> <b>KT2440</b> para generar posibles inoculantes en polvo. ....	29
Se envió el manuscrito relacionado con la capacidad de <i>P. putida</i> <b>KT2440</b> para tolerar la liofilización . ....	31
Discusión .....	33





Conclusión.....	37
Perspectivas .....	37
Bibliografía. ....	38

## Índice de Gráficos

Gráfica 1. Supervivencia de <i>P. putida</i> KT2440 (log UFC/mL) tras la liofilización con la mezcla de trehalosa/ myo-inositol a diferentes concentraciones .....	26
Gráfica 2 Supervivencia de <i>P.putida</i> KT2440 (log UFC/mL) tras la liofilización con la mezcla de trehalosa/ myo-inositol a diferentes concentraciones .....	27

## Índice de Tablas

Tabla 1. Concentraciones de los tratamientos a utilizar para proteger a <i>P.putida</i> KT2440 en la liofilización .....	22
Tabla 2. BSR de <i>P.putida</i> KT2440 a la liofilización usando una mezcla de lioprotectores (trehalosa-myoinositol) a distintas concentraciones. Entre paréntesis se muestra la desviación estándar (DS). Los datos mostrados son resultados del promedio de cinco repeticiones por cada tratamiento. La clasificación de los colores depende del valor de BSR de acuerdo con Pazos-Rojas et al., 2018 .....	28

## Índice de ilustraciones

1Tubos con muestras liofilizadas.....	24
---------------------------------------	----





## Resumen

El uso indebido de fertilizantes químicos, pesticidas, y otros agroquímicos para aumentar la producción de cultivos ha traído consecuencias ambientales nocivas causadas por la acumulación en los suelos. Una la alternativa para disminuir el uso de estos compuestos es diseñar inoculantes bacterianos. En estudios anteriores se han diseñado formulaciones líquidas inoculantes de segunda generación que promueven el crecimiento y mejoran el rendimiento de cultivos de interés agrícola. La desventaja que presentan estos inoculantes es que requieren de refrigeración para mantener su viabilidad, lo cual incrementa los costos de producción. Por ello se propone formular inoculantes en forma de polvo. Para obtener el inoculante en forma de polvo se propone realizar el proceso de liofilización por ser un método eficaz para la preservación y fácil transporte. En este trabajo se propone formular inoculantes en polvo usando a la bacteria *Pseudomonas putida* KT2440 debido a que es sensible a desecación, Estudios previos con *P. putida* KT2440 han demostrado que la liofilización en presencia de trehalosa (200 mM) produce un cristal que es frágil, mientras que, en presencia de myo-inositol (200 mM) el cristal resultante es altamente poroso y rígido pero la viabilidad disminuye (1). Es por ello, que se propone utilizar la mezcla de ambos protectores en diferentes concentraciones para determinar la concentración más adecuada que permita una elevada viabilidad, estabilidad y una estructura rígida del producto, que facilite su rehidratación, teniendo una alternativa para la formulación de inoculantes estables con una prolongada vida. De acuerdo con los datos obtenidos la concentración más adecuada para proteger a *P. putida* KT2440 y mantener la viabilidad fue trehalosa (200 mM) / Myo-inositol (200 mM). No hubo crecimiento *P. putida* KT2440 sin ningún protector a los 12 días después de la liofilización por lo que se observó que no entra a un estado viable no cultivable.





## Introducción

Durante la revolución verde se inició una ola de investigaciones para incrementar la producción de cultivos, aumentando así el uso indebido de fertilizantes nitrogenados, pesticidas y herbicidas químicos, sin contemplar las consecuencias. Estos compuestos tóxicos se acumulan en los suelos de cultivo provocando su deterioro, aumentando así, la contaminación ambiental (4). Además, estos compuestos tóxicos presentan entre sus componentes a los nitratos, organoclorados y los organofosforados, los cuales son causantes de daños a la salud en los seres humanos (5). La perspectiva viable para dejar de utilizar fertilizantes nitrogenados y/o pesticidas es comenzar a sustituirlos por biofertilizantes, además se debe eliminar los compuestos tóxicos de suelos contaminados, beneficiando así al medio ambiente y a su vez promover el crecimiento de las plantas utilizando microorganismos benéficos (6).

Dentro de los microorganismos benéficos existen especies de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés: Plant Growth Promoting Rhizobacteria) que potencian el crecimiento de las plantas mediante diferentes mecanismos directos e indirectos. Los mecanismos directos son cuando las bacterias sintetizan nutrientes para la planta como, por ejemplo, la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos y la producción de fitohormonas. Los mecanismos indirectos son aquellos encargados de proteger de patógenos a las plantas, entre estos mecanismos encontramos a los de biocontrol, de producción de ACC desaminasa, de Resistencia Sistémica Inducida (ISR), de Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) y compuestos volátiles (7). Las PGPR son consideradas bacterias benéficas y además también tienen la posibilidad de eliminar compuestos tóxicos para el medio ambiente y las plantas (8, 9). Asimismo, dentro de las PGRP encontramos especies biorremediadores que pueden reducir la contaminación ambiental, por ejemplo, algunos agentes eficientes incluyen especies de *Bacillus* sp., *Arthrobacter* sp., *Ralstonia* sp., *Rhodococcus* sp., *Yersinia* sp. y *Pseudomonas* sp. (10).







Las PGPR se han usado como biofertilizantes, bioinoculantes, pesticidas microbianos, así como agentes biocontrol. Por estas razones han sido aceptadas como un medio rentable. Además, aumentan el rendimiento y controlan las enfermedades de las plantas por lo que son un medio sostenible para dejar de utilizar los pesticidas y fertilizantes químicos en la agricultura (10, 11).

### Inoculantes bacterianos

En México existe una norma oficial mexicana que se debe considerar para la realización de estudios de efectividad biológica de los insumos de nutrición vegetal., la cual define a un inoculante como un “Insumo de nutrición vegetal elaborado con base en microorganismos que, al aplicarse al suelo o las semillas, favorece el aprovechamiento de los nutrientes en asociación con la planta o su rizosfera” (NOM-077-FITO-2000).

Los inoculantes bacterianos al aplicarlos en las semillas, plantas o suelo benefician el crecimiento vegetal mediante diversos mecanismos directos e indirectos aplicándolo a nivel agrícola con el fin de aumentar la producción, y además de preservar al medio ambiente (12).

Los inoculantes compuestos de las PGRP han traído beneficios a la agricultura; mejorando la fertilidad del suelo, aumentan el rendimiento del cultivo y calidad nutricional, protege a las plantas de cultivo contra diversos patógenos. Por ejemplo, si durante el crecimiento de la planta existe un estrés estos inoculantes ayudan a superarlo y no causa un riesgo al medio ambiente.

Por lo tanto, las PGRP mejoran el crecimiento, la producción y la salud de las plantas. Debido a sus características son buenas candidatas para realizar formulaciones de inoculantes (13).

El método de obtención de inoculantes consiste en aislar del suelo o de las raíces de las plantas determinados microorganismos, que se puedan reproducir y que influyan en la planta de manera beneficiosa, sin daño ecológico. Para diseñar un inoculante adecuado éste debe contener ciertas características principalmente; ser





compatible con el cultivo donde será utilizado, debe ser de fácil aplicación, es necesario que contenga microorganismos con la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones tanto en el cultivo como en el suelo, además éstos deben estar viables durante el almacenamiento prolongado y tras la inoculación en el campo (14). Un inoculante puede ser conformado por una sola cepa o tener un consorcio bacteriano. Para obtener un inoculante de buena calidad deberá elegirse a una o unas cepas bacterianas capaces de adaptarse a dicho ambiente y que capte los nutrientes, por consiguiente la bacteria deberá ser eficaz en promover el crecimiento de la planta inoculada, para ello deberá colonizar adecuadamente a la planta sin causar daño y poseer una adecuada supervivencia (15).

Las formulaciones de inoculantes pueden estar físicamente como líquidos o como sólidos (16).

Los inoculantes líquidos son suspensiones que contiene un vehículo o agente protector, el cual puede ser agua, aceite, azúcares o polímeros con el fin de estabilizar y hacer más fácil su aplicación. Su procedimiento de obtención es fácil y económico. También contienen un soporte esterilizable al calor, pero tienen el inconveniente de que deben ser mantenidas en refrigeración, su transporte bajo condiciones refrigeradas incrementa los costos y la vida en anaquel solo ha sido estudiada hasta por dos años (17).

Existen inoculantes líquidos exitosos como los inoculantes que contienen *Azospitillum* sp. por su capacidad de interactuar con las plantas y promover su crecimiento por la vía de fijar nitrógeno producir fitohormonas y sideróforos entre otros (18).

Otro tipo de inoculante líquido es el que contiene a *Pseudomonas fluorescens* como agente de biocontrol. En él se observó una disminución de hongos patógenos de las plantaciones de banana (19).





Los inoculantes bacterianos de segunda generación son formulaciones líquidas que han resultado ser muy exitosas para promover el crecimiento de plantas de interés agrícola (20).

Los inoculantes líquidos resultan ser fáciles de manejar, manipular, pero presentan la desventaja que ocupan mayor espacio de almacenamiento, ya que deben estar en refrigeración, y puede disminuir la viabilidad si no se almacena adecuadamente (21).

Por otro lado, las formulaciones sólidas generalmente están contenidas en un soporte o vehículo orgánico e inorgánico como por ejemplo; turba, alginato, arcilla, lodos de biogás, vermiculita, estos tienen el inconveniente de contener microorganismos que son propios debido a que no hay un método de esterilización adecuado para este material, generalmente se usa el gas acetileno para disminuir la carga bacteriana (14).

Los inoculantes en forma de polvo pueden ser una excelente alternativa para disminuir los costos de transporte y almacenamiento, estos pueden ser sólidos en forma de polvo húmedo, granulado y polvo humedecible. Estos polvos podrían ser obtenidos por desecación, liofilización, secado al vacío, secado por dispersión y métodos de concentración celular (22). Sin embargo, la supervivencia y efectividad de bacterias benéficas Gram-negativas ha sido poco estudiada bajo condiciones de baja disponibilidad de agua (23), además las células podrían mostrar una viabilidad disminuida debido al daño en sus membranas celulares provocando la muerte (14, 16, 24). En consecuencia, este trabajo propone obtener inoculantes en polvo por medio de la liofilización, de modo que tendrá el beneficio de que las bacterias permanecen latentes, las células bacterianas serán resistentes a las condiciones de estrés ambientales y serán más fácil aplicación, así como de menor costo de almacenamiento y transporte.

### *Pseudomonas putida* KT2440

*P. putida* KT2440 interacciona con gran variedad de vegetales haciéndola candidata para ser usada en inoculantes microbianos (25). Se ha observado su capacidad de promover el crecimiento de maíz y *Echinocactus platyacanthus* ((13)(26).





Esta bacteria es saprófita, se ha aislado en suelo, plantas, agua y animales (27) y deriva de la cepa *P. putida* PWWO. A diferencia de la cepa KT2440, ésta ya no contiene el plásmido TOL. Sin embargo, KT2440 mantiene la capacidad de tolerar compuestos recalcitrantes y es capaz de utilizar como fuente de carbono a compuestos aromáticos (25, 28)

*P. putida* KT2440 contiene diversas vías para la transformación de una variedad de compuestos aromáticos codificados en su genoma (29) por lo que degrada a los compuestos recalcitrantes. Asimismo tiene la capacidad de colonizar la rizobacteria de plantas, además, es utilizada en áreas como; la biocatálisis, como agente de biocontrol y en la producción de plásticos igualmente es buena promotora de crecimiento de plantas (20, 29).

Debido a sus características para biorremediar y promover el crecimiento de plantas *P. putida* KT2440 (25, 30) podría ser usada para bioaugmentación o en la formulación de inoculantes para potenciar el crecimiento de plantas.

## Liofilización

Es un método eficaz para la preservación, transporte y almacenamiento de microorganismos a largo plazo (31). El método puede ser aplicado en diferentes áreas como en la industria farmacéutica, biotecnológica, alimentaria y química. El objetivo del método consiste en sacar el agua de producto sin afectar su estabilidad a temperatura ambiente la liofilización de la sustancia pura cambia de una fase sólida a gas (sublimación), debe de realizarse en condiciones de presión y temperatura menores del punto triple del agua (273.16 K y a una presión de 611.73 Pa). El proceso involucra las siguientes etapas:(32, 33).

1. Congelación: Congelar el agua libre del producto a temperaturas entre -12°C.- 20°C o -80°C.
2. Desección primaria: sublimación del solvente congelado
3. Evaporación del agua de la matriz amorfa





4. Deseccación secundaria evaporar el agua no congelable o agua ligada, lo que queda es una fase de soluto concentrado y obteniendo un producto liofilizado

Al cambiar la fase se obtiene un producto en polvo o sustancia dura, muy higroscópico que conserva el volumen y tamaño original presentando la forma de un vidrio altamente poroso. La ventaja que presenta esta estructura es que permite una rápida rehidratación, el producto se reproduce muy cercanamente su aspecto y sus propiedades originales. La liofilización es prácticamente un proceso de deshidratación o desecado en frío sin que cause daño a la sustancia a liofilizar. No obstante el material liofilizado es frágil por lo que requiere de una protección con el objetivo de prevenir daños ocasionados por la manipulación, además la porosidad de dicha estructura es necesaria para empacar el producto de tal forma que se evite la penetración de oxígeno (34).

Esta técnica ha sido utilizada en almacenamiento de microorganismos con mucho éxito, ciertos estudios muestran la viabilidad de bacterias liofilizadas por 50 años de almacenamiento (35), acentuando que la tasa de supervivencia durante el almacenamiento dependerá del género, especie bacteriana, de las condiciones de rehidratación, el medio de liofilización y/o condiciones físicas de almacenamiento. Si se liofilizan bacterias se debe utilizar una solución lioprotectora para mantener la viabilidad celular evitando así la desnaturalización de proteínas debido a las diversas tensiones a las que se someten las células durante el proceso, actuando además como material de soporte y receptor en la rehidratación del producto liofilizado. La mayor parte del conocimiento generado para la liofilización de microorganismos ha sido empírico y no hay un protector universal que sea capaz de mantener la viabilidad de los microorganismos liofilizados (31, 33).

## Protectores

Los lioprotectores son sustancias que se añaden con el objetivo de mejorar las características del producto durante el proceso de liofilización y/o de almacenamiento. Se





pueden clasificar según su naturaleza química; disacáridos, polialcoholes, sales, aminoácidos y sustancias proteicas (31).

Si al momento de estar liofilizando la temperatura se incrementa ocurre un fenómeno de hundimiento de estructura caracterizado por la interrupción de la sublimación, pérdida de rigidez implicando una mala apariencia final del producto sino también una deshidratación incompleta y una pérdida de la actividad de la sustancia a liofilizar (36). Hay pocos trabajos que han explorado la supervivencia de las bacterias benéficas al proceso de liofilización y aún no se conoce una forma adecuada para mantener la viabilidad de las bacterias a largo plazo. Los disacáridos no reductores han resultado importantes en el mantenimiento de la viabilidad de las bacterias desecadas tanto en liofilización como en desecación en aire (1, 37). Dentro de estos compuestos se encuentra la trehalosa

## Trehalosa

Trehalosa compuesto por dos residuos de glucosa unidos por un enlace  $\alpha$  1,1 - glucosídico. Naturalmente trehalosa se encuentra en plantas, insectos y nemátodos (38). Protege, estabiliza a proteínas y a membranas biológicas cuando existe condiciones ambientales de estrés (temperatura, salinidad, estrés oxidativo y desecación). Se ha observado que en *Selaginella lepidophylla* aumenta sus niveles de trehalosa al activar mecanismos para tolerar la desecación (39). Para comprender el papel que juega trehalosa en la protección de proteínas durante algún estrés se han propuesto teorías como; la teoría de vitrificación, teoría de sustitución de agua, teoría de exclusión. Por ello ha sido utilizado como lioprotector, aditivo, y estabilizador.

Sin embargo, si las células se resguardan en presencia de oxígeno, la supervivencia es afectada (17).

## Myo-inositol

Sustancia cristalina, no reductora, alto punto de fusión y estables a altas temperaturas. Se encuentra presente en los tejidos de animales formando parte de





fosfolípidos, en vegetales como fosfatos (ácido fitico). Se sintetiza myo-inositol de forma endógena a partir de glucosa (40).

En este trabajo se plantea como objetivo encontrar alternativas para formular inoculantes en polvo de *P. putida* KT2440. Esta bacteria es un excelente modelo de estudio debido a que es sensible a desecación, pero su supervivencia se incrementa al agregarle un protector antes de la desecación mediante liofilización, siendo la trehalosa (200 mM) uno de los mejores candidatos de buen protector. Sin embargo, el cristal obtenido con este protector es frágil (1). Por otra parte, si se utiliza Myo-inositol (200 mM) como protector, el cristal obtenido es altamente poroso y rígido pero la viabilidad disminuye (1, 31, 37). Para obtener beneficios de cada uno de estos protectores se propone hacer una mezcla de ambos a diferentes concentraciones, hasta encontrar una concentración que nos dé viabilidad y un liofilizado con estructura rígida, para su resguardo estable y de fácil rehidratación (3).

Al obtener una mezcla adecuada de protectores, éste se utilizará para generar inoculantes en forma de polvo, obteniendo una buena supervivencia además de facilitar su almacenamiento, distribución, uso y aplicación a los cultivos agrícolas, principalmente sin afectar las propiedades benéficas de *P. putida* KT2440.





## Antecedentes

Una de las limitantes más fuertes para la efectividad de un inoculante es la capacidad de las bacterias para resistir a la desecación (22, 23). Las bacterias sensibles pueden morir tras la inoculación de semillas, si después del sembrado no hay agua y ocurre una desecación. Por ejemplo, *Bradyrhizobium japonicum* muere en cuestión de horas tras la pérdida de agua (23, 41). De esta forma, las características de las bacterias benéficas podrían ser nulos debido a su sensibilidad a la desecación.

La desecación es la pérdida de agua de las células hasta alcanzar el equilibrio con el agua presente en el entorno, una desecación extrema ocurre a 30 °C y 50% de Humedad relativa (HR). Durante el metabolismo celular disminuye hasta que se detiene y por consiguiente al ser rehidratadas se recuperan sus funciones fisiológicas (42). La desecación al aire, considerada como desecación lenta, las células sufren estrés por oxidación y pérdida de agua, razón por la cual el número de células viables disminuye notablemente para organismos sensibles.

Por lo tanto la desecación puede causar efectos perjudiciales a la cepa sensible desde cambios morfológicos como son: encogimiento, variación en la textura, contracciones en las capas externas e incluso daños a nivel de proteínas, ácidos nucleicos y pérdida de fluidez de la membrana celular y por consecuencia perder la viabilidad de la bacteria (43). Ciertas bacterias pueden tener estrategias para evitar los daños que causan a la desecación modificando sus estructuras celulares, y producen compuestos que permiten protegerse (44).

Hasta hace poco tiempo, se consideró que KT2440 era altamente sensible a la desecación (23, 45), no obstante, recientemente se observó que esta bacteria entra a un estado viable pero no cultivable durante la desecación y regresa rápidamente a un estado cultivable tras la rehidratación con exudados de plantas o de forma lenta tras una rehidratación rápida (37). Aparentemente una reparación en la membrana plasmática conduce al retorno para un estado cultivable. En liofilización se desconoce si la bacteria







es capaz de entrar a un estado viable pero no cultivable y solo se ha explorado su supervivencia tras una rehidratación rápida (1, 45).

El proceso de liofilización es ideal para incrementar la viabilidad de la célula durante la desecación rápida cuando se usa un protector adecuado (31). Las soluciones protectoras mantienen la viabilidad de las bacterias evitando la desnaturalización de proteínas y protegiendo a la membrana de las células vivas contra el daño generado durante la liofilización (35). Al agregar trehalosa como lioprotector se incrementó la supervivencia bacteriana al proceso de liofilización, observando además que para alcanzar una tasa de supervivencia alta se necesita que el cultivo bacteriano este en la fase estacionaria (1).

En otros estudios se han analizado los efectos de supervivencia de *Saccharomyces cerevisiae* que por el método de liofilización con trehalosa (como protector), fue posible obtener una mejora en la supervivencia para una concentración del 5% de trehalosa interna durante la deshidratación (46).

*Escherichia coli* DH5 alfa y *Bacillus thuringiensis* HD-1 tienen mayor tolerancia a la liofilización cuando se secan en presencia de disacáridos como la trehalosa (concentración de 100 Mm) y sacarosa, se atribuyó el aumento de la supervivencia a la capacidad de los azúcares para proteger la estructura de la proteína en estado seco (47).

Otros estudios donde se utilizan mezcla de protectores se mencionan a continuación: el agente de biocontrol *Paenibacillus polymyxa* con la finalidad de aplicarlo como biofungicida sometiendo a la liofilización para buscar las mejores condiciones del proceso y el número ideal de células, añadiendo al proceso una mezcla de distintos agentes protectores, siendo la más eficaz la mezcla de lactosa y sacarosa que obtuvo mayor tasa de viabilidad celular después del proceso de liofilización (48).

*Lactobacillus rhamnosus* CTC1679, *Lactobacillus casei/paracasei* CTC1677 y *L. casei/paracasei* CTC1678 son utilizados como probióticos, su propósito era tener una mayor supervivencia en la liofilización usando distintos protectores, observaron que después de la liofilización el porcentaje de células viables fue de 94%





empleando la combinación de protectores de leche descremada con trehalosa o lactosa, ambas combinaciones presentaron estabilidad después de 39 semanas de almacenamiento en refrigeración de 4°C (49).

También se realizaron estudios con la cepa de *Lactococcus lactis* Sr. 3.54 sometiénola a procesos de congelación y liofilización, se utilizó una mezcla de protección de distintos protectores siendo el más eficaz y con mayor viabilidad, la mezcla con leche desnatada y sacarosa, estos estudios tuvieron el objetivo de obtener polvos para la industria alimentaria (50).

Distintos microorganismos fueron liofilizados y después de 50 años de almacenamiento (2-4°C) las muestras tuvieron células viables suficientes para mantener los cultivos, utilizaron mezcla de dos protectores como fue 1% de gelatina/10% de sacarosa y otra mezcla de leche descremada suplementada con glucosa al 7% (51).





## Justificación

En la actualidad son notorias las consecuencias de usar compuestos recalcitrantes, tales como fertilizantes químicos, herbicidas y pesticidas (37), razón por la que se han propuestos métodos alternativos ecológicos para mantener el rendimiento de los cultivos. Es así como se ha ofrecido utilizar microorganismos que tengan la capacidad de biorremediar y a su vez que éstos promuevan en el crecimiento de las plantas.

Existen bacterias promotoras del crecimiento vegetal que han sido utilizadas para formular inoculantes líquidos de segunda generación, las cuales han resultado ser exitosas en la promoción de crecimiento de plantas de interés agrícola, aunque tiene la desventaja que durante el almacenamiento y transporte se requiere condiciones de refrigeración para conservar la viabilidad del inoculante y así evitar una disminución en sus efectos benéficos, por lo que eleva los costos de producción, por lo tanto, se propone formular un inoculante de polvo usando como modelo de estudio a *P. putida* KT2440 por medio de la liofilización.

Debido a lo anteriormente mencionado, el presente proyecto establecerá la concentración óptima de una mezcla de protectores trehalosa / myo-inositol que permita una viabilidad, estabilidad y una estructura adecuada facilitando el uso del inoculante, sin que se vea afectado las propiedades benéficas de *P. putida* KT2440 durante el proceso de liofilización.

## Hipótesis

*P. putida* KT2440 aumentará su supervivencia si se utiliza una mezcla de lioprotectores (trehalosa / myo-inositol) durante el proceso de liofilización, permitiendo una mejora en su almacenamiento a temperatura ambiente, facilitando su transporte.





## Objetivo general

Explorar el uso de una mezcla de trehalosa / myo-inositol como protector de *P. putida* KT2440 a la liofilización

## Objetivos particulares

- ♣ Evaluar la capacidad de mezclas de trehalosa / myo-inositol para proteger a *P. putida* KT2440 de la liofilización.
- ♣ Llevar a cabo una revisión bibliográfica en el tema de tolerancia a la desecación de *P. putida* KT2440 para su posible publicación en una revista nacional arbitrada.
- ♣ Realizar un análisis de datos generados en el grupo de Ecología y Supervivencia de Microorganismos (no publicados) relacionados con la capacidad de *P. putida* KT2440 para tolerar la liofilización y desecación ambiental con el objetivo de conjuntarlos con los datos obtenidos en este trabajo para preparar un manuscrito que será sometido a la publicación en una revista JCR.





## Materiales y Métodos

### Medios de cultivo

La cepa bacteriana *P. putida* KT2440 se cultivó hasta la fase estacionaria en medio LB (Lauria Bertani) el cual se le adicionó cloranfenicol a una concentración de 100 µg/ml (LB-Cm 100) (1).

### Lioprotectores

El disacárido trehalosa ( $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot 2H_2O$ , 99%) (Sigma-Aldrich) y myo-inositol ( $C_6H_{12}O_6$ , 99%) (Sigma-Aldrich), fueron los protectores utilizados, por cada uno de los protectores se preparó una solución con volumen de 200 mL a una concentración de 200 mM. Posteriormente a partir de cada una de las soluciones protectoras se diluyeron a las demás concentraciones mostrada en la Tabla 1.

### Liofilización de *P. putida* KT2440

Las células de *P. putida* KT2440 se incubaron hasta alcanzar la fase estacionaria, después se centrifugaron a 5000 rpm, una vez obtenido a la célula aglomerada (pellet) en el fondo del tubo. Las células bacterianas fueron lavadas con agua destilada estéril y se re-suspendieron con el mismo volumen con la mezcla de lioprotectores, la cual se adicionará en diferentes concentraciones representadas en la Tabla 1.

Se realizó el conteo del número de células bacterianas por el método GSPM (52) en medio LB (5 repeticiones) las muestras se dividieron en tubos Eppendorf ( 1.5 ml) agregando 500 µl de la suspensión con la mezcla del lioprotectores y a cada tubo se le colocó un tapón de algodón.

Una vez obtenidas las muestras, éstas se congelaron a  $-20^{\circ}C$  durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, las muestras se colocaron en el liofilizador Virtis a 30 mTorr durante 27 horas.





Tabla 1. Concentraciones de los tratamientos a utilizar para proteger a *P.putida* KT2440 en la liofilización

Número de mezcla	Concentración de Trehalosa / Myo-inositol (mM)
1	200 / 200
2	200 / 0
3	175 / 25
4	150 / 50
5	125 / 75
6	100 / 100
7	75 / 125
8	50 / 150
9	25 / 175
10	0 / 200
11	0 / 0

### Determinación del número de células viables después de la liofilización.

Obtenidas las muestras se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Transcurrido el tiempo las muestras se colocaron en el liofilizador Virtis a 30 mTorr durante 27 horas.





Una vez terminada la liofilización las células se cuantificaron por quintuplicado para registrar el número de células cultivables. La cuantificación se realizó a los 20 min. 24 y 48 y 12 días de rehidratación.

Posteriormente, se agregó 500 µL de agua destilada estéril a los liofilizados, el contenido se agitó con una micropipeta con el objetivo de rehidratar, posteriormente se cuantifico el número de células a las 24 h y 48 h subsiguiente al inicio de la rehidratación y a los 12 días después de liofilización rehidratando durante 20 min

Para cada tiempo se calculó la tasa de supervivencia bacteriana (BSR) el cual es la relación del logaritmo del número de células bacterianas presentes en la muestra después de ser liofilizadas (DPL), respecto al logaritmo del número de células viables antes liofilización (AL) multiplicada por 100 (3, 42).

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





## Resultados

Determinación de la concentración trehalosa / myo-inositol con mayor tasa de supervivencia de *P. putida* KT2440.

Las células de *P. putida* KT2440 fueron suspendidas en 500 µl con la mezcla de

Lioprotectores Trehalosa / Myo- inositol (mM)	Lioprotectores Trehalosa / Myo- inositol (mM)
<b>200 / 200</b>	<b><i>P. putida</i> KT2440</b>
<b>200 / 0</b>	<b>0 / 200</b>
<b>175 / 25</b>	<b>25 / 175</b>
<b>150 / 50</b>	<b>50 / 150</b>
<b>125 / 75</b>	<b>75 / 125</b>
<b>100 / 100</b>	

1 Tubos con muestras liofilizadas

lioprotectores que se muestran en la Tabla 1. Por cada una de las distintas concentraciones de trehalosa / myo-inositol se prepararon 45 tubos. Se colocaron 150 tubos eppendorf en el liofilizador.

El proceso de liofilización tuvo una duración aproximada de 27 horas. Los liofilizados obtenidos se muestran en la Figura 1.

En la Figura 1. se señalan los liofilizados obtenidos a diferentes concentraciones de la mezcla de trehalosa / myo-inositol, el aspecto físico de las muestras liofilizadas que contenían concentraciones mayores a 150 mM de myo-inositol abarcaron mayor volumen este fue aproximadamente similar al volumen inicial (antes de ser liofilizado), asimismo; se observó que eran más estables al movimiento. Mientras que los liofilizados que tuvieron una







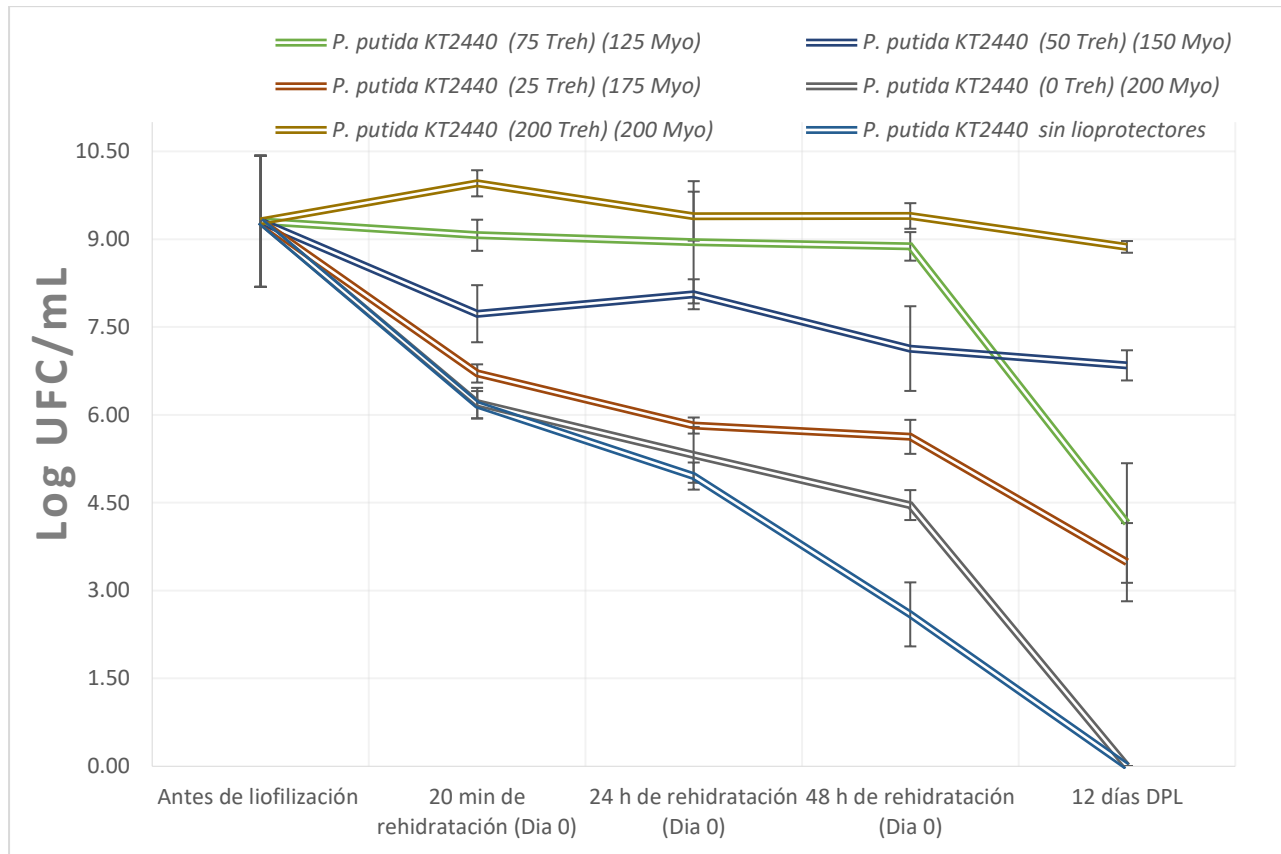
concentración de trehalosa mayor o igual a 100 mM, se observaron con menor volumen en comparación con el inicial y el aspecto fue irregular, además, las muestras al movimiento se colapsaban.

Posteriormente se cuantificó el número de células bacterianas por el método GSPM antes de la liofilización (AL) y a diferentes tiempos después de la liofilización (DL) (20 min. 24 h, 48 h de rehidratación y 12 días posteriores con 20 min de rehidratación).

Antes de la liofilización el número de bacterias se encontraban en  $2.4 \times 10^9$  UFC/ml  $\pm 0.11$ , posteriormente la supervivencia de *P. putida* KT2440 sin protectores fue de 6.27 Log UFC/mL durante los 20 min. de rehidratación posteriormente a la liofilización, después de 12 días no hubo crecimiento (Gráfico 1).

Mientras que la supervivencia de *P. putida* KT2440 con la mezcla de trehalosa / myo-inositol mejoró sustancialmente. Cuando ambos lioprotectores se encontraban en una concentración de 200 mM a los 12 días DL se observaron en 8.87 Log UFC/mL. además, se observó que cuando el lioprotector de myo-inositol se encontraba a concentraciones mayores a 150 mM y la trehalosa con concentraciones menores a 100 mM la supervivencia de *P. putida* KT2440 disminuyó DL como se muestra en el Gráfico 1.

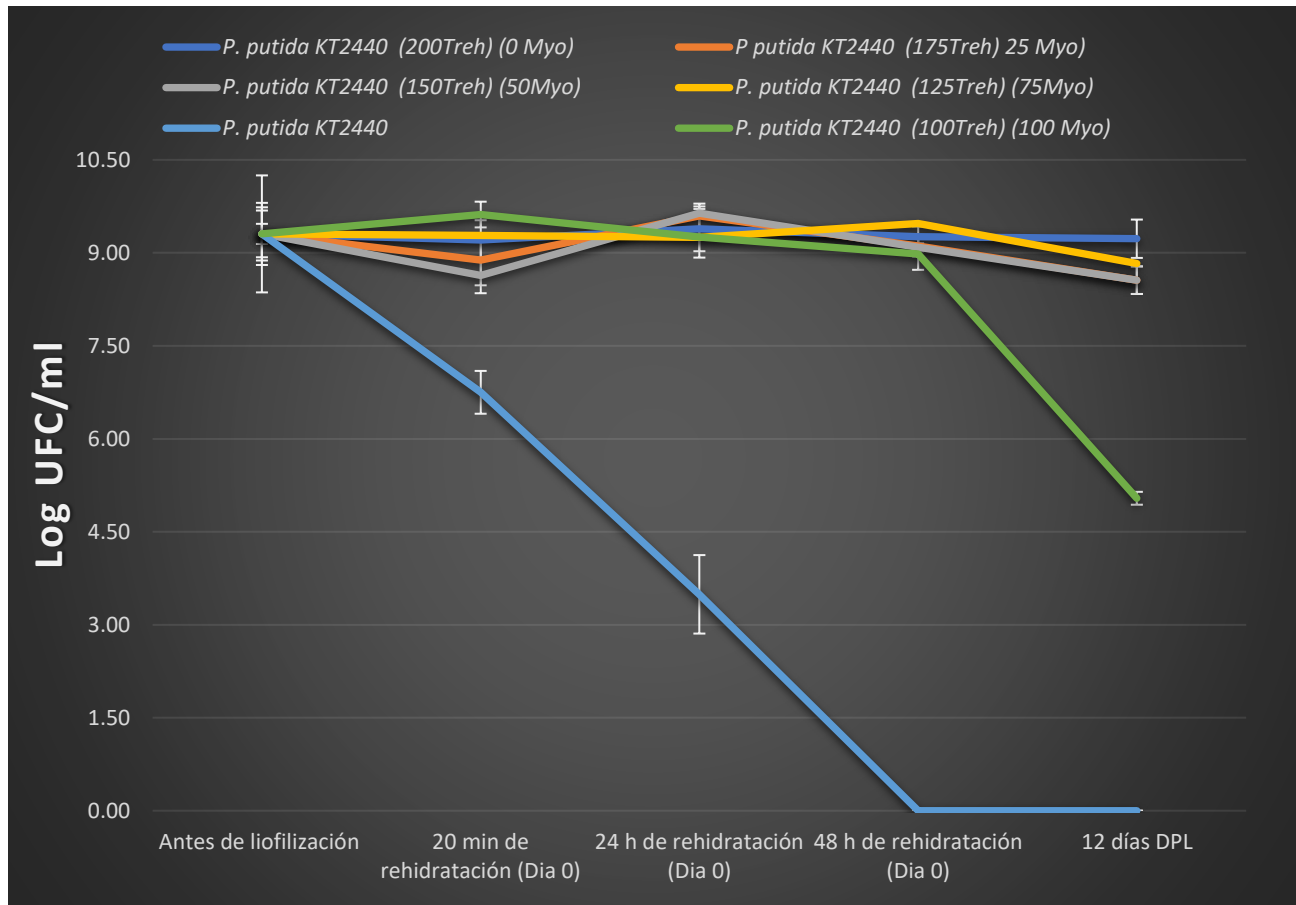




Gráfica 1. Supervivencia de *P. putida* KT2440 (log UFC/mL) tras la liofilización con la mezcla de trehalosa/ myo-inositol a diferentes concentraciones

En el Gráfico 2 se muestra el número de bacterias que sobreviven después de la liofilización con concentraciones mayores a 100 mM, de trehalosa. Asimismo, se observó que si la mezcla trehalosa / myo-inositol se encontraba con concentraciones 100 mM / 100 mM se reducía el número de células a los 12 días DL con un número de 5.04 log UFC/mL, mientras que en concentraciones mayores a 100 mM de trehalosa y menores de 100 mM myo-inositol, se observa una mayor supervivencia, en un rango de 9.23 a 8.56 Log UFC/mL (Gráfico 2).





Gráfica 2 Supervivencia de *P.putida* KT2440 (log UFC/mL) tras la liofilización con la mezcla de trehalosa/ myo-inositol a diferentes concentraciones

Se representaron estos mismos datos expresados en la tasa de supervivencia bacteriana (BSR) en la Tabla 2.

El número de células antes de la liofilización se considera el máximo valor de supervivencia a alcanzar (BSR=100), los datos mostrados son resultado del promedio de cinco repeticiones por cada tratamiento.

Pazos-Rojas *et al.*, (2018) clasifico los rangos en función de la supervivencia bacteriana en la desecación del aire. Tomando esa misma clasificación para el proceso de liofilización en donde también se observó el proceso de desecación en diferentes condiciones de temperatura y presión. La clasificación corresponde entonces a los siguientes valores de BSR; bacterias altamente tolerantes (BSRad>80) (azul),





tolerantes ( $60 < \text{BSRad} \leq 80$ ) (verde), tolerante medio ( $40 < \text{BSRad} \leq 60$ ) (amarillo limón), tolerante bajo ( $20 < \text{BSRad} \leq 40$ ) (amarillo oscuro) y muy poco tolerante a la desecación ( $\text{BSRad} \leq 20$ ) (rojo), Tabla 2.

Tabla 2. BSR de *P.putida* KT2440 a la liofilización usando una mezcla de lioprotectores (trehalosa-myo-inositol) a distintas concentraciones. Entre paréntesis se muestra la desviación estándar (DS). Los datos mostrados son resultados del promedio de cinco repeticiones por cada tratamiento. La clasificación de los colores depende del valor de BSR de acuerdo con Pazos-Rojas et al., 2018

<i>P. putida</i> KT2440		día 0 después de la liofilización			
Concentración de Trehalosa / Myo-inositol (mM)	Antes de liofilización	20 min. de rehidratación	24 h de rehidratación	48 h de rehidratación	12 días después de liofilización (20 min. de rehidratación)
200 / 200	100 ( $\pm 0.00$ )	106.98 ( $\pm 2.40$ )	100 ( $\pm 4.49$ )	100 ( $\pm 4.49$ )	95.31 ( $\pm 1.08$ )
200 / 0	100 ( $\pm 0.00$ )	97.26 ( $\pm 3.36$ )	99.17 ( $\pm 3.81$ )	97.81 ( $\pm 1.75$ )	97.48 ( $\pm 3.21$ )
175 / 25	100 ( $\pm 0.00$ )	93.84 ( $\pm 4.30$ )	101.37 ( $\pm 2.09$ )	96.22 ( $\pm 1.80$ )	90.42 ( $\pm 2.35$ )
150 / 50	100 ( $\pm 0.00$ )	91.23 ( $\pm 3.04$ )	101.84 ( $\pm 0.71$ )	96.01 ( $\pm 0.70$ )	90.42 ( $\pm 2.35$ )
125 / 75	100 ( $\pm 0.00$ )	98.04 ( $\pm 2.20$ )	97.71 ( $\pm 3.19$ )	99.35 ( $\pm 2.27$ )	93.26 ( $\pm 2.77$ )
100 / 100	100 ( $\pm 0.00$ )	101 ( $\pm 2.19$ )	97.78 ( $\pm 3.51$ )	94.87 ( $\pm 2.68$ )	53.25 ( $\pm 1.10$ )
75 / 125	100 ( $\pm 0.00$ )	97.4 ( $\pm 2.86$ )	91.24 ( $\pm 11.22$ )	95.4 ( $\pm 2.62$ )	53.27 ( $\pm 10.98$ )
50 / 150	100 ( $\pm 0.00$ )	83.04 ( $\pm 5.24$ )	86.61 ( $\pm 2.75$ )	76.65 ( $\pm 7.77$ )	73.57 ( $\pm 2.77$ )
25 / 175	100 ( $\pm 0.00$ )	72.08 ( $\pm 1.68$ )	62.53 ( $\pm 1.47$ )	60.45 ( $\pm 3.12$ )	37.45 ( $\pm 7.18$ )
0 / 200	100 ( $\pm 0.00$ )	66.62 ( $\pm 2.81$ )	57.13 ( $\pm 5.12$ )	47.93 ( $\pm 2.75$ )	0.00 ( $\pm 0.0$ )
0 / 0	100 ( $\pm 0.00$ )	66.35 ( $\pm 2.49$ )	53.26 ( $\pm 2.49$ )	27.87 ( $\pm 5.87$ )	0.00 ( $\pm 0.0$ )

Se observó que la mezcla 200 mM trehalosa / 200 mM myo-inositol tuvo una mayor BSR (95.31 ( $\pm 1.08$ )) después de los 12 días posteriores a la liofilización. Similares resultados presentaron las mezclas con concentraciones arriba de 125 mM de





trehalosa y menores concentraciones de myo-inositol la BSR resultante tuvo un rango de 90.42 ( $\pm 2.35$ ) a 97.48 ( $\pm 3.21$ ) (Tabla 2). Estos últimos resultados obtenidos, permiten por lo tanto mencionar estas concentraciones de lioprotectores son viables para proteger a *P. putida* KT2440.

Cuando las concentraciones de trehalosa son menores a 100 mM y myo-inositol mayores a 100 mM la BSR disminuyó drásticamente alcanzando valores de 73.57 ( $\pm 2.77$ ) hasta 37.45 ( $\pm 7.18$ ) para 12 días después de liofilización con 20 min de rehidratación.

La supervivencia de *P. putida* KT2440 sin ningún lioprotector disminuyó después de la liofilización a las 48 horas de rehidratación, siendo la BSR de 27.87 ( $\pm 5.87$ ) y a los 12 días después de la liofilización ya no hubo crecimiento (Tabla 2).

Publicación de un artículo de revisión abarcando temas sobre la tolerancia a la desecación de *P. putida* KT2440 para generar posibles inoculantes en polvo.

Durante la realización de esta tesis de maestría se publicó un artículo de Revisión, recopilando datos e información acerca de *Pseudomonas putida* KT2440 haciendo énfasis en la tolerancia a la desecación con las perspectivas de generar inoculantes de segunda generación en forma de polvo, puesto que, *P. putida* KT2440 es bacteria que promueve el crecimiento vegetal y, además, biorremediadora de compuestos xenobióticos. Llevando por título “Rumbo a la generación de inoculantes en polvo a base de *P. putida* KT2440”, muestro la caratula.

El artículo completo lo encontrara en el siguiente enlace.








<https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/16412>

<http://doi.org/10.5281/zenodo.7099040>





## Rumbo a la generación de inoculantes en polvo a base de *Pseudomonas putida* KT2440

Elizabeth Alonso-Torres<sup>1</sup>  **iD**, Yesmin Panecatí Bernal<sup>2</sup>  **iD**, José Joaquín Alvarado-Pulido<sup>2</sup>  **iD**, Luis Ernesto Fuentes-Ramírez<sup>3</sup>  **iD**, Javier Martínez-Morales<sup>4</sup>  **iD**, Jesús Muñoz-Rojas<sup>1\*</sup>  **iD**, Yolanda Elizabeth Morales-García<sup>1,5\*\*</sup>  **iD**

<sup>1</sup>Grupo "Ecology and Survival of Microorganisms", Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México. <sup>2</sup>Centro de Investigación en Dispositivos Semiconductores, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México. <sup>3</sup>Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México. <sup>4</sup>Laboratorio de Fisiología Microbiana de la Interacción Microorganismo-Hospedero, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México. <sup>5</sup>Facultad de Ciencias Biológicas, Licenciatura en Biotecnología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

Email autores para correspondencia: \*[joymerre@yahoo.com.mx](mailto:joymerre@yahoo.com.mx); \*\*[yolanda.moralesg@correo.buap.mx](mailto:yolanda.moralesg@correo.buap.mx)

**Recibido:** 01 junio 2022. **Aceptado:** 5 septiembre 2022

### RESUMEN

La adición de fertilizantes nitrogenados, pesticidas y herbicidas en los cultivos agrícolas, ha traído enormes consecuencias para el ambiente y la salud de los organismos terrestres. Las bacterias promotoras del crecimiento de plantas podrían ser una alternativa para evitar el uso de esos productos sin arriesgar o disminuir los rendimientos de los cultivos. *Pseudomonas putida* KT2440 es una bacteria capaz de biodegradar compuestos orgánicos y también de promover el crecimiento de plantas; especialmente bajo condiciones de estrés ambiental. Por esta razón, esta bacteria ha sido seleccionada para el diseño de inoculantes de segunda generación. Los inoculantes de segunda generación en la actualidad están en formulaciones líquidas que requieren de refrigeración para mantenerlas estables. Es deseable contar con formulaciones que no requieran energía para su almacenamiento y transporte, por lo que las formulaciones en polvo serían las más apropiadas para mantener la estabilidad hasta su aplicación a un bajo costo. Para conseguir esto se requieren estudios de la tolerancia a la desecación de las bacterias de interés y conocer cómo podemos potenciar la supervivencia de las bacterias benéficas bajo condiciones de estrés por disminución de la actividad de agua. En este trabajo se ha revisado el panorama general del conocimiento que se tiene sobre la supervivencia de *P. putida* KT2440 a la desecación ambiental y la desecación por liofilización, la ayuda por protectores, la función de la membrana bacteriana, así como algunos genes clave que podrían estar implicados en la tolerancia a la desecación de esta bacteria.

**Palabras clave:** *Pseudomonas putida* KT2440; inoculantes bacterianos; desecación; liofilización; supervivencia bacteriana.

87

Artículo de revisión





Se envió el manuscrito relacionado con la capacidad de *P. putida* KT2440 para tolerar la liofilización .

Se llevo a cabo la redacción del manuscrito que lleva por título “Incremento de la supervivencia de *Pseudomonas putida* KT2440 a la liofilización mediante el uso de una mezcla de Trehalosa/Myo-inositol”, posteriormente se mandó a la revista, a continuación, muestro el acuse de recibido.

**Incremento de la supervivencia de *Pseudomonas putida* KT2440 a la liofilización mediante el uso de una mezcla de Trehalosa/Myo-inositol**

Elizabeth Alonso-Torres<sup>1</sup>, Jesús Muñoz-Rojas<sup>1</sup>, Yesmin Panecatl Bernal<sup>2</sup>, José Joaquín Alvarado-Pulido<sup>2</sup>, Laura Abisai Pazos-Rojas\*<sup>1,3</sup>, Yolanda Elizabeth Morales-García\*<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Grupo “Ecology and Survival of Microorganisms”, Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

<sup>2</sup>Centro de Investigación en Dispositivos Semiconductores, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Biológicas, Licenciatura en Biotecnología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

<sup>4</sup>Facultad de Estomatología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.





RV: [ABC] Acuse de recibo del envío



Asunto: [ABC] Acuse de recibo del envío

Yolanda Elizabeth Morales-García:

Gracias por enviar el manuscrito "INCREMENTO DE LA SUPERVIVENCIA DE PSEUDOMONAS PUTIDA A LA LIOFILIZACIÓN USANDO UNA MEZCLA DE TREHALOSA/MYO-INOSITOL" a Acta Biológica Colombiana. Con el sistema de gestión de publicaciones en línea que utilizamos podrá seguir el progreso a través del proceso editorial tras iniciar sesión en el sitio web de la publicación:

URL del manuscrito: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/authorDashboard/submission/105988>

Nombre de usuario/a: 7eliza\_morales2

Si tiene alguna duda puede ponerse en contacto conmigo. Gracias por elegir esta editorial para mostrar su trabajo.

Hernan Mauricio Romero

Acta Biológica Colombiana [racbiocol\\_fcbog@unal.edu.co](mailto:racbiocol_fcbog@unal.edu.co) Universidad Nacional de Colombia (Sede Bogotá). Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol>

**Aviso legal:** El contenido de este mensaje y los archivos adjuntos son confidenciales y de uso exclusivo de la Universidad Nacional de Colombia. Se encuentran dirigidos sólo para el uso del destinatario al cual van enviados. La reproducción, lectura y/o copia se encuentran prohibidas a cualquier persona diferente a este y puede ser legal.

Si usted lo ha recibido por error, infórmenos y elimínelo de su correo. Los Datos Personales serán tratados conforme a la Ley 1581 de 2012 y a nuestra Política de Datos Personales que podrá consultar en la página web [www.unal.edu.co](http://www.unal.edu.co). Las opiniones, informaciones, conclusiones y cualquier otro tipo de dato contenido en este correo electrónico, no relacionados con la actividad de la Universidad Nacional de Colombia, se entenderá como personales y de ninguna manera son avaladas por la Universidad.

La información contenida en este correo se dirige exclusivamente a su destinatario; puede contener **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL** cuya divulgación está prohibida por la ley. Si recibió este mensaje por error, evite su utilización, reproducción, o difusión, debiendo eliminarlo de su computadora o cualquier dispositivo electrónico y comunicarlo inmediatamente por esta vía a su emisor.

La información de este correo, así como la contenida en los documentos que se adjuntan, pueden ser objeto de solicitudes de acceso a la información, sin perjuicio de las limitantes legales al derecho de acceso a la información.

Puede consultar los avisos de privacidad para el tratamiento de datos personales con diversas finalidades en <https://transparencia.buap.mx>.

La información contenida en este correo se dirige exclusivamente a su destinatario; puede contener **INFORMACIÓN CONFIDENCIAL** cuya divulgación está prohibida por la ley. Si recibió este mensaje por error, evite su utilización, reproducción, o difusión, debiendo eliminarlo de su computadora o cualquier dispositivo electrónico y comunicarlo inmediatamente por esta vía a su emisor.

La información de este correo, así como la contenida en los documentos que se adjuntan, pueden ser objeto de solicitudes de acceso a la información, sin perjuicio de las limitantes legales al derecho de acceso a la información.

Puede consultar los avisos de privacidad para el tratamiento de datos personales con diversas finalidades en <https://transparencia.buap.mx>.







## Discusión

La población mundial de acuerdo con el informe perspectivas de la Población Mundial oscila los 8000 millones de habitantes, esto hace que la producción de alimentos aumente para satisfacer las necesidades de los habitantes. En los años de 1960 a 1980 con este mismo objetivo surgió la revolución verde, utilizando fertilizantes sintéticos, pesticidas y/o herbicidas para satisfacer las demandas, a medida surgió el aumento del cambio climático, la degradación del agua, la erosión de los suelos, y afecciones a la salud humana. Debido a lo anteriormente mencionado hoy se deben ajustar las prácticas agrícolas con el objetivo de disminuir los impactos negativos sobre el medio ambiente.(53, 54)

Una alternativa es utilizar microorganismos benéficos en la agricultura, estos microorganismos diseñados en forma de inoculantes bacterianos deberán de contar con la capacidad de proporcionar nutrientes a las plantas de cultivo, contrarrestar los diversos estreses abióticos y bióticos que existen durante el cultivo, además, de comenzar a restaurar por medio de la biorremediación a los suelos contaminados, empleando la agricultura sostenible (54, 55)

Existe una bacteria que cuenta con esas características ideales y forma parte de PGRP. *Pseudomonas putida* KT2440 se ha observado que promueve el crecimiento de plantas las más estudiadas son en el maíz y, tiene la capacidad de eliminar compuestos xenobióticos por estas razones se ha propuesto para formular inoculantes de segunda generación en el cual se han observado una mejora en los cultivos. Sin embargo, una de la limitante para el aprovechamiento de sus potencialidades es su sensibilidad a la desecación (56).

En el grupo de Ecología y supervivencia bacteriana se han diseñado inoculantes líquidos de segunda generación de forma exitosa, pero resultan ser un problema en el almacenamiento y transporte haciendo costoso su producción, por lo que, la alternativa es diseñar inoculantes en forma de polvo por medio de la liofilización a base





de *P. putida* KT2440. Según Parada (2010) la liofilización es un proceso de secado en el que se elimina el agua por congelación del producto húmedo y posterior sublimación del hielo en condición de vacío, obteniendo un producto con nula actividad acuosa que otras técnicas de secado y el liofilizado será más estable.

Se debe de utilizar un protector adecuado para proteger a la bacteria de las condiciones agresivas del liofilizado, se ha mencionado que una mayoría de disacáridos pueden proteger a *P. putida* KT2440 de la liofilización (3, 17), es por ello que en este trabajo se propuso realizar una mezcla de protectores trehalosa y myo-inositol., debido a la desecación que se lleva a cabo en la liofilización, pudiéndose afectar la supervivencia de *P. putida* KT2440. En los resultados se observa que si no se coloca ningún protector la supervivencia *P. putida* KT2440 disminuye, observándose una BSR de 53.26 ( $\pm 2.49$ ) a las 24 horas de rehidratación, la cual comienza a disminuir con 48 horas de rehidratación (BSR = 27.87 ( $\pm 5.87$ )). Asimismo, a los 12 h. después de la liofilización con 20 minutos de rehidratación no se percató crecimiento.

Investigaciones anteriores propusieron una recombinante de *P. putida* KT2440 para tolerar mejor la desecación pero *P. putida* KT2440 resulto no ser capaz de sintetizar trehalosa para resistir la desecación por liofilización (45).

Recientemente Pazos-Rojas *et al.*, 2019, observó a *P. putida* KT2440 que, durante la desecación entra a un estado viable no cultivable (VBNC) resurgiendo a un estado cultivable cuando existe la disponibilidad de agua o con exudados de planta, aparentemente mediada por la reparación de la membrana citoplasmática. Se observó que en el proceso de liofilización *P. putida* KT2440 no ocurre VBNC ya que si se rehidrata a los 20 min hasta las 48 horas de rehidratación los valores de BSR ((57.13 ( $\pm 5.12$ ) a 27.87 ( $\pm 5.87$ )), disminuyen si no existe ningún protector o si el myo-inositol se encuentra en 200 mM y trehalosa con concentraciones bajas e incluso hay una disminución de la supervivencia bacteriana durante la rehidratación prolongada, el método de liofilización difiere de la desecación ambiental ya que se presentan varios tipos de estrés adicionales a la desecación ambiental como la congelación de la muestra,





cambios de presión de 1 atm a 0 atm durante la liofilización y retorno a 1 atm tras la liofilización (56). Los valores bajos se podría deber que en el proceso de liofilización no ocurre una adaptación gradual de las células al estado desecado y por lo tanto no prepara a las células para entrar a un estado de dormancia. Asimismo, la congelación que se llevo a cabo antes de la liofilización este proceso debe ser rápido para no formar cristales de hielo grandes y así evitar que dañen a las membranas, si se daña la supervivencia, otros factores serian, la temperatura el contenido de humedad y la presencia de oxígeno después del sellado (57) las muestras de este trabajo estuvieron a temperatura ambiente.

Se sabe que trehalosa a sido un protector eficaz en la supervivencia de *P. putida* KT2440 cuando es crecida hasta la fase estacionaria (3). En investigaciones anteriores el producto liofilizado con trehalosa ha resultado frágil al movimiento en gran parte se podría deber a que si la temperatura de transición disminuye a medida que la humedad de trehalosa aumenta, en el rango de bajo contenido de agua (1), además durante el secado de la solución celular, forma una película, lo que ralentiza significativamente las tasas de desecación. En este caso se obtuvo que a concentraciones mayores de 125 mM de trehalosa y myo-inositol por debajo de 75 mM no se vio afectada, *P. putida* KT2440 logro una alta tolerancia. Por otra parte, el liofilizado o producto fue de volumen pequeño su aspecto fue irregular pero fue mas resistente al movimiento y como vemos en la Tabla 2 la BSR estuvo por arriba de 90 lo que nos indica una alta tolerancia, en gran parte puede deberse al protector de myoinositol, se ha reportado que es mas resistente al movimiento aunque, la supervivencia bacteriana disminuye (2).

Los resultados obtenidos indican que a concentraciones mayores de 125 mM de myo-inositol y menores de 75 mM de trehalosa la tolerancia es media ( $40 < BSR_{dl} \leq 60$ ). La disminución de la BSR se puede deber a lo ya reportado el cristal resultante es altamente poroso y rígido permitiendo un mayor tiempo de preservación aunque la viabilidad disminuye (3).

Se podría pensar que una mezcla ideal es trehalosa 200 mM/myo-inositol 0 mM obteniendo una BSR (97.48 ( $\pm 3.21$ )) a los 12 días después de la liofilización siendo mayor





a la mezcla de trehalosa 200 mM/ myo-inositol 200 Mm (BSR=95.31 ( $\pm 1.08$ )) , las diferencias en su aspecto físico del producto liofilizado teniendo un mayor rendimiento de producto la mezcla perteneciente a de trehalosa 20 mM / myo-inositol 200 Mm (Fig. 1), mientras que trehalosa 20 mM/myo-inositol 0 mM, el volumen del producto fue menor, en aspectos de Marketing la apariencia física del inoculante liofilizado será menos aceptado por los agricultores, es así como este trabajo recomienda utilizar la mezcla trehalosa 200 mM / myo-inositol 200 mM para formular inoculantes de segunda generación de *P. putida* KT2440.

Este trabajo además recopiló información para comenzar a diseñar inoculantes de segunda generación en forma de polvo permitiendo con una prolongada vida de anaquel. Y tomando los datos de este trabajo, se diseñó un manuscrito enviando a una revista para su posible publicación.





## Conclusión

- La mejor concentración fue la mezcla de trehalosa (200 mM / myo-inositol (200 mM) por ser altamente tolerante y su aspecto físico es un aspecto poroso y rígido.
- Para formular inoculantes en forma de polvo eficaces, con viabilidad adecuada y con una mayor vida de anaquel se propone añadirle al proceso una mezcla de protectores para que exista una sinergia, los protectores dependerán de cada organismo a liofilizar.
- *P. putida* KT2440 durante la liofilización no se observó que entrase a un estado viable no cultivable, por lo que la supervivencia en estas condiciones difiere la supervivencia a la desecación donde si pueden lograr entrar a un estado viable no cultivable y retornar a números altos tras la rehidratación prolongada.

## Perspectivas

- ✓ Para entender si existe un daño a la membrana cuando *P. putida* KT2440 decrece su supervivencia se debe de revisar, para determinar si las bacterias tienen las membranas dañadas, mediante el uso del kit LIVE/DEAD y observación microscópica
- ✓ Utilizar la mezcla trehalosa 200 mM/ myo-inositol 200 mM para evaluar la estabilidad a largo plazo, permitiendo mantener a las células en estado desecado y listas para recuperar su cultivabilidad y funcionalidad tras la rehidratación.





## Bibliografía.

1. Muñoz-Rojas J, Bernal P, Duque E, Godoy P, Segura A, Ramos J. 2006. Involvement of Cyclopropane Fatty Acids in the Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to Freeze-Drying Involvement of Cyclopropane Fatty Acids in the Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to Freeze-Drying. *Appl Environ Microbiol* 72:472–477.
2. Morales-García Yolanda-Elizabeth D, Rodríguez-Andrade O, Jesús de la Torre, Rebeca-Débora Martínez-Contreras RP-T y JM-R. 2010. Bacterias Preservadas , una Fuente Importante de Recursos Biotecnológicos. *Bio Tecnol* 14.
3. Muñoz-Rojas J, Bernal P, Duque E, Godoy P, Segura A, Ramos J. 2006. Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. *Appl Environ Microbiol* 72:472–477.
4. Yadav G, Srivastva R, Gupta P. 2021. Endophytes and Their Applications as Biofertilizers Microbial Technology for Sustainable Environment.
5. Montgomery MP, Postel E, Umbach DM, Richards M, Watson M, Blair A, Chen H, Sandler DP, Schmidt S, Kamel F. 2017. Pesticide use and age-related macular degeneration in the agricultural health study. *Environ Health Perspect* 125:1–9.
6. Baez-Rogelio A, Morales-García Y, Quintero-Hernández V, Muñoz-Rojas J. 2017. Next generation of microbial inoculants for agriculture and bioremediation. *Microb Biotechnol* 10:19–21.
7. Morales-García Y., Baez A, Quintero-Hernández V, Molina-Romero D, Rivera-Urbalejo AP, Pazos-Rojas LA, Muñoz-Rojas J. 2019. Bacterial Mixtures, the Future Generation of Inoculants for Sustainable Crop Production. <http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-30926-8>.
8. Molina-Romero D, Bustillos-Cristales, maria del R, Rodríguez-Andrade O, Morales-García YE, Santiago-Saenz Y, Castañeda-Lucio M, Muñoz-Rojas J. 2015. Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias , aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biológicas* 17:24–34.
9. Vivanco-Calixto R, Molina-Romero D, Y.E. M-G, V. Q-H, A. M-H, A. B-R, J. M-R. 2016. Reto agrobiotecnológico: inoculantes bacterianos de segunda generación. *Alianzas y Tendencias* 1:9–19.
10. Nayak SK, Baliyarsingh B, Singh A, Mannazzu I, Mishra BB, Agriculture S. 2022. Advances in Agricultural and Industrial Microbiology *Advances in Agricultural and Industrial Microbiology*.
11. Yadav AN. 2021. Soil Microbiomes for Sustainable Agriculture Functional Annotation.
12. Pazos-Rojas LA, Marín-Cevada V, Elizabeth Y, García M, Baez A. 2016. Uso de microorganismos benéficos para reducir los daños causados por la revolución verde. *Rev Iberoam Ciencias* 3:72–85.
13. Molina-Romero D, Morales-García YE, Bustillos-Cristales MR, Rodríguez-Andrade O, Santiago-Saenz Y, Muñoz-Rojas J, Castañeda- Lucio M. 2015. Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias , aislamientos en América y potencial biotecnológico Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias , aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Rev la DES Ciencias Biológico Agropecu* 17 (2):24–34.





14. Bashan Y, de-Bashan LE, Prabhu SR, Hernandez JP. 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant Soil* 378:1–33.
15. Santiago-Saenz Y. 2014. Efecto de un inoculante multiespecies (emmim-1) en papa *Solanum tuberosum*, cv. Atlantic, propagada en el laboratorio y crecida en invernadero. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla,.
16. Viñals M, Villar J. 1999. Avances En La Formulación Y Aplicación De Inoculantes Bacterianos De Uso Agrícola 20:9–17.
17. Hernandez-tenorio ana laura. 2018. Preservación efectiva mediante liofilización de cepas del inoculante multi-especies EMMIM-1. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
18. Cassán F, Diaz-Zorita M. 2016. Azospirillum sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. *Soil Biol Biochem* 103:117–130.
19. Selvaraj S, Ganeshamoorthi P, Anand T, Raguchander T, Seenivasan N, Samiyappan R. 2014. Evaluation of a liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense and *Helicotylenchus multicinctus* in banana plantation. *BioControl* 59:345–355.
20. Morales-García YE, Baez A, Quintero-Hernández V, Molina-Romero D, Rivera-Urbalejo AP, Pazos-Rojas LA, Muñoz-Rojas J. 2019. Bacterial Mixtures, the Future Generation of Inoculants for Sustainable Crop Production BT - Field Crops: Sustainable Management by PGPR, p. 11–44. *In* Maheshwari, DK, Dheeman, S (eds.), . Springer International Publishing, Cham.
21. Lobo CB, Juárez Tomás MS, Viruel E, Ferrero MA, Lucca ME. 2019. Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. *Microbiol Res* 219:12–25.
22. Berninger T, González López Ó, Bejarano A, Preininger C, Sessitsch A. 2018. Minireview Maintenance and assessment of cell viability in formulation of non-sporulating bacterial inoculants. *Microb Biotechnol* 368:277–300.
23. Pazos-Rojas LA, Rodríguez-andrade O, Muñoz-arenas LC, Morales- YE, Corral-lugo A, Quintero-hernández V, Baez A, Molina-romero D, Muñoz- J. 2018. Desiccation-Tolerant Rhizobacteria Maintain their Plant Growth- Promoting Capability after Experiencing Extreme Water Stress 1.
24. Kaminsky LM, Trexler R V., Malik RJ, Hockett KL, Bell TH. 2019. The Inherent Conflicts in Developing Soil Microbial Inoculants. *Trends Biotechnol* 37:140–151.
25. Molina-Romero D, Morales-García YE, Hernández-Tenorio AL, Castañeda-Lucio M, Netzahuatl-Muñoz A-R, Muñoz-Rojas J. 2017. *Pseudomonas putida* estimula el crecimiento de maíz en función de la temperatura. *Rev Iberoam Ciencias*.
26. Alatorre-Cruz JM, Bustillos-Cristales, María del Gutiérrez Sánchez H, Y.E. M-G, Molina-Romero D, Netzahuatl Muñoz RA, Muñoz-Rojas J. 2013. Estimulación del crecimiento de *Echinocactus platyacanthus* con bacterias PGPR.





27. Martins Dos Santos VAP, Heim S, Moore ERB, Strätz M, Timmis KN. 2004. Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* 6:1264–1286.
28. Regenhardt D, Heuer H, Heim S, Fernandez DU, Strömpl C, Moore ERB, Timmis KN. 2002. Brief report Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440. *Environ Microbiol* 4:912–915.
29. Nelson KE, Weinel C, Paulsen IT, Dodson RJ, Hilbert H, Martins dos Santos VAP, Fouts DE, Gill SR, Pop M, Holmes M, Brinkac L, Beanan M, DeBoy RT, Daugherty S, Kolonay J, Madupu R, Nelson W, White O, Peterson J, Khouri H, Hance I, Chris Lee P, Holtzapple E, Scanlan D, Tran K, Moazzez A, Utterback T, Rizzo M, Lee K, Kosack D, Moestl D, Wedler H, Lauber J, Stjepandic D, Hoheisel J, Straetz M, Heim S, Kiewitz C, Eisen J, Timmis KN, Dusterhöft A, Tümmler B, Fraser CM. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* 4:799–808.
30. Matilla MA, Ramos JL, Bakker PAHM, Doornbos R, Badri D V, Vivanco JM, Ramos-gonzález MI. 2010. *Pseudomonas putida* KT2440 causes induced systemic resistance and changes in Arabidopsis root exudation. *Environ Microbiol* 2:381–388.
31. Morales-García Y-E, Duque E, Rodríguez-Andrade O, de la Torre J, Martínez-Contreras R-D, Pérez R, Muñoz-Rojas J. 2010. Bacterias Preservadas , una Fuente Importante de Recursos Biotecnológicos. *Bio Tecnol* 14:11–29.
32. Adams G. 2007. The Principles of Freeze-Drying 368:15–38.
33. Tindall BJ. 2007. Vacuum-drying and cryopreservation of prokaryotes. *Methods Mol Biol* [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2_5).
34. Ramirez Navajas J sebastián. 2014. Liofilización de alimentos. *Reciteia* 6 n.2.
35. Grauer A, Zardo S, Grunberg K. 2015. Puesta a Punto De Un Protocolo De Liofilización Para La Creación De Bancos Bacterianos 50.
36. Moreira T, Gutiérrez A, Delgado H. 1994. Aspectos físicos relacionados con los aditivos en el proceso de liofilización. Papel relevante de los carbohidratos. *Biotecnol Apl*.
37. Pazos-Rojas LA, Muñoz-Arenas LC, Rodríguez-Andrade O, López-Cruz LE, López-Ortega O, Lopes-Olivares F, Luna-Suarez S, Baez A, Morales-García YE, Quintero-Hernández V, Villalobos-López MA, De la Torre J, Muñoz-Rojas J. 2019. Desiccation-induced viable but nonculturable state in *Pseudomonas putida* KT2440, a survival strategy *Plos One*.
38. Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM. 1992. Anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 54:579–599.
39. Pampurova S, Van Dijck P. 2014. The desiccation tolerant secrets of *Selaginella lepidophylla*: What we have learned so far? *Plant Physiol Biochem* 80:285–290.
40. Ruiz Aceituno L, Ramos RiverO L, Sanz Murias ML. 2012. Inositoles en alimentos: estructura, propiedades y funcionalidad. *Aliment Nutr Y Salud* 19:1–12.







41. Streeter JG. 2003. Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. *J Appl Sci Environ Manag* 484–491.
42. Pazos-rojas LA, Rodríguez-andrade O, Muñoz-arenas LC, García YEM-, Corral-lugo A, Quintero-hernández V, Baez A, Molina-romero D, Muñoz-rojas J. 2018. La desecación tolerante Rhizobacterias mantener su capacidad Promoción de la planta Crecimiento- después de experimentar estrés *Agua Extrema* 1,4 1–13.
43. Hernández-Canseco J. 2015. Supervivencia a la desecación de bacterias que cointeraccionan antes del estrés. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
44. Rodríguez, Andrade O, Bernal P, R. M contreras, Y.E. M-G, Molina-romero D, marin cevada V, America R urbalejo, Muñoz-Rojas J. 2013. Estrategias bacterianas para contrarrestar el estrés causado por frío y/o por congelación- descongelación y panorama de tolerancia de las rizobacterias. *J Chem Inf Model* 53:1689–1699.
45. Manzanera M, Castro AG De, Tøndervik A, Strøm AR, Tunnacliffe A. 2002. Hydroxyectoine Is Superior to Trehalose for Anhydrobiotic Engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Environ Microbiol* 68:4328–4333.
46. Cerrutti P, Segovia De Huergo M, Galvagno M, Schebor C, Del Pilar Buera M. 2000. Commercial baker's yeast stability as affected by intracellular content of trehalose, dehydration procedure and the physical properties of external matrices. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:575–580.
47. Leslie SB, Israeli E, Lighthart B, Crowe JH, Crowe LM. 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl Environ Microbiol* 61:3592–3597.
48. Nasran HS, Yusof HM, Halim M, Rahman NA. 2020. Optimization of protective agents for the freeze-drying of *Paenibacillus polymyxa* Kp10 as a potential biofungicide. *Molecules* 25.
49. Jofré A, Aymerich T, Garriga M. 2015. Impact of different cryoprotectants on the survival of freeze-dried *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei/paracasei* during long-term storage. *Benef Microbes* 6:381–386.
50. Berner D, Viernstein H. 2006. Effect of protective agents on the viability of *Lactococcus lactis* subjected to freeze-thawing and freeze-drying. *Sci Pharm* 74:137–149.
51. Kupletskaya MB, Netrusov AI. 2011. Viability of lyophilized microorganisms after 50-year storage. *Microbiology* 80:850–853.
52. Corral-Lugo A, Morales-García YE, Pazos-Rojas LA, Ramírez-Valverde A, Débora Martínez-Contreras R, Muñoz-Rojas J. 2012. Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de "Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo. *Colomb Biotecnológica* 14:147–156.
53. Gornall J, Betts R, Burke E, Clark R, Camp J, Willett K, Wiltshire A. 2010. Implications of climate change for agricultural productivity in the early twenty-first century. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 365:2973–2989.
54. Mahtab R, Teli B, Kumar G, Dobhal P, Yadav DL, Belbase S, Patel JS, Yadav SK, Sarkar A. 2022.





Conservation Strategies for Rhizobiome in Sustainable Agriculture 37–61.

55. Chakma J, Singh PS, Bhutia DD. 2022. Rhizospheric Microbes and Plant Health 18. Springer, Singapore 373–389.
56. Alonso Torres E, Panecatl Bernal Y, Alvarado-Pulido JJ, Fuentes-Ramírez LE, Martínez-Morales J, Muñoz-Rojas J, Morales-García YE. 2022. Rumbo a la generación de inoculantes en polvo a base de *Pseudomonas putida* KT2440. Alianzas y Tendencias BUAP 7:87–116.
57. Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. 2006. Preservation of micro-organisms by drying; A review. J Microbiol Methods 66:183–193.

