

## Bacterias Preservadas, una Fuente Importante de Recursos Biotecnológicos

Yolanda-Elizabeth Morales-García<sup>1</sup>, Estrella Duque<sup>2</sup>, Osvaldo Rodríguez-Andrade<sup>1</sup>, Jesús de la Torre<sup>2</sup>, Rebeca-Débora Martínez-Contreras<sup>3</sup>, Rocío Pérez-y-Terrón<sup>4</sup> y Jesús Muñoz-Rojas<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología de Suelos, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM), Instituto de Ciencias (IC), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). Edificio 103 J, Ciudad Universitaria, San Manuel, Puebla, México. C. P. 72570. \*E-mail: [joymerre@yahoo.com.mx](mailto:joymerre@yahoo.com.mx)

<sup>2</sup>Departamento de Protección Ambiental, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Profesor Albareda No. 1, Granada, España. C. P. 18008.

<sup>3</sup>Laboratorio de Bioquímica y Genética Microbiana, CICM, IC, BUAP. Edificio 103 J, Ciudad Universitaria, San Manuel, Puebla, México. C. P. 72570.

<sup>4</sup>Escuela de Biología, BUAP. Edificio 76, Complejo de Ciencias, Ciudad Universitaria, San Manuel, Puebla, México. C. P. 72570.

### RESUMEN

Las bacterias sostienen la vida de nuestro planeta y aunque solo se conoce alrededor del 1% de su diversidad, muchas de ellas pueden resultar benéficas para ser utilizadas con fines agrícolas, biomédicos y de biorremediación, entre otros. En la actualidad se tiene especial interés en descubrir tanto a nuevas especies bacterianas, así como en estudiar la función que desempeñan los genes que conforman a algunas bacterias de interés; mediante estrategias de mutagénesis y secuenciación. En ambos casos es necesario contar con métodos de preservación de bacterias adecuados que permitan estudios futuros. En el presente trabajo se discuten varias metodologías para preservar a las bacterias de forma correcta, tomando en consideración que se deben mantener sus características fenotípicas, genotípicas y una alta viabilidad. Estas características también asegurarán el mantenimiento del gran potencial biotecnológico que las bacterias resguardan en sus genomas.

**Palabras clave:** Bacteria, preservación, congelación, liofilización.

## ABSTRACT

Bacteria sustain life on earth, and even though we only know around 1% of its diversity, several of them could result beneficial when used in different domains, including agriculture, biomedicine, bioremediation, and others. Nowadays, strong effort has been put into elucidating both new bacterial species and the function encoded in their genes; through mutagenesis and sequencing methods. Given the importance of working with bacteria from different sources, it is necessary to count on reliable methods to preserve bacteria successfully, allowing the researcher to use the precise same strain over his research. At the present work, we discuss several methodologies to preserve bacteria properly, while ensuring that they maintain a high viability as well as their phenotypic and genotypic characteristics. The improvement of these preserving techniques will ensure the conservation of the great biotechnological potential that bacteria contain in their genomes.

**Key words:** Bacteria, preservation, freeze, freeze drying.

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias sostienen la vida de nuestro planeta (Kerr, 1997, Pace, 1996, Pace, 1997; Strom, 2008) y aunque solo se conoce alrededor del 1% de su diversidad (Amann *et al.*, 1995; Cardenas & Tiedje, 2008; Curtis *et al.*, 2002), muchas de ellas pueden resultar benéficas para ser utilizadas con fines biotecnológicos (Broadbent *et al.*, 2003; Chemier *et al.*, 2009), agrícolas (Bloemberg & Lugtemberg, 2001), biomédicos (Morales-García *et al.*, 2007), ecológicos (Straight & Kolter, 2009) y de biorremediación (Paul *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2005). Por ejemplo, algunas bacterias promueven el crecimiento de las plantas a través de diferentes mecanismos, entre los que se incluyen la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN), el aumento de disponibilidad de nutrientes en la rizósfera, la influencia positiva en la morfología y tamaño de las raíces de la planta, el control biológico y la potenciación de otras simbiosis benéficas planta-microorganismo (Lugtemberg and

Kamilova, 2009, Lucy *et al.*, 2004, Vessey, 2003). En general las bacterias que expresan estos mecanismos son conocidas como rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR, por sus siglas en inglés). Otras bacterias degradan compuestos tóxicos para los seres humanos y el medio ambiente (Paul *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2005), muchas de ellas producen compuestos antimicrobianos que pueden usarse en el tratamiento de diversas enfermedades (Morales-García *et al.*, 2007; Muñoz-Rojas, 2004; Riley & Wertz, 2002), y/o productos importantes para la industria (Broadbent *et al.*, 2003).

Debido a las características tan versátiles de metabolismo que presentan las bacterias, los investigadores han estado muy interesados en aislar nuevas especies bacterianas y descubrir otras potencialidades que puedan ser aplicadas para el beneficio humano. Las bacterias se originaron aproximadamente hace 2.5 billones de años (Battistuzzi, 2004) y se considera que

albergan características genéticas que han evolucionado desde entonces y que podemos utilizarlas para nuestro beneficio. Para estudiar y explotar esas potencialidades, es conveniente resguardar a las bacterias en bancos, conservando sus características y viabilidad (Uruburu, 2003). En esta revisión se discutirá la forma en que los microorganismos podrían ser preservados correctamente para ser posteriormente estudiados con detenimiento.

## **PRESERVACIÓN DE MICROORGANISMOS**

Una vez que hemos aislado a las bacterias de interés, estas deben de ser caracterizadas mediante ensayos de taxonomía polifásica (Vandamme *et al.*, 1996) y además es deseable resguardarlas para estudios futuros. La preservación de bacterias es un paso muy importante, debido a que las bacterias representan un potencial biotecnológico enorme, así que si guardamos a estos microorganismos, de cierta forma estamos resguardando dicho potencial.

Para la correcta conservación de los diferentes microorganismos debemos tomar en consideración 3 recomendaciones (García & Uruburu, 2000): se deben evitar posibles contaminaciones durante el proceso de conservación, durante el tiempo en que los microorganismos permanezcan conservados conviene que sobrevivan en números elevados y los microorganismos conservados deben de permanecer genéticamente estables. Existen métodos de conservación

variados para los distintos microorganismos y es importante mencionar que ninguno de ellos es universal, por lo que se debe de elegir el método que más se ajuste a nuestros medios técnicos, la infraestructura del laboratorio y al microorganismo que se desea preservar.

El resguardo de las bacterias puede realizarse de tres formas generales: preservación a corto, mediano y largo plazo. Es importante mencionar que la forma de preservar a las bacterias ha sido poco explorada (García & Uruburu, 2000; Uruburu, 2003) y mucho del conocimiento que se tiene recabado en la actualidad se ha obtenido de forma empírica.

### *Preservación a corto plazo*

Esta forma de resguardo se utiliza cuando los laboratorios no tienen un potencial económico suficiente, por ejemplo, no hay un ultracongelador. El método comúnmente usado es la resiembra continua. El microorganismo en cuestión se siembra en su medio adecuado y una vez crecido se guarda a 4°C donde se mantiene unos días para su uso y se vuelve a resembrar en un tiempo no mayor a un mes. El gran problema de la resiembra continua de un microorganismo, es que se pueden generar mutaciones y adaptación al medio de cultivo, lo que termina generando cepas “domesticadas” (Cooper, 2002) cuyo comportamiento ya no representa a la especie inicialmente aislada.

Existen otros métodos de conservación alternativos bastante utilizados para diversos tipos de microorganismos como los hongos filamentosos, las levaduras y algunas bacterias. Un método consiste en suspender a los microorganismos en agua destilada estéril o agua de mar estéril (en el caso de microorganismos marinos) (García & Uruburu, 2000). Para hongos filamentosos que no esporulan se pueden poner trocitos de agar en suspensión con el crecimiento del hongo. Interesantemente, *P. fluorescens*, *P. viridiflava*, *Erwinia* sp., *Xanthomonas campestris*, *Cytophaga johsonae*, *Salmonella* sp., *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *S. aureus* han sido preservadas en agua y en solución de fosfatos salina, observando que sobreviven en números elevados en la segunda condición respecto a agua sola (Liao & Shollenberger, 2003). En agua algunas bacterias podrían morir y liberar sus componentes, que a su vez, podrían ser usados por otras bacterias para su crecimiento consecutivo. Por esta razón, en cada caso será importante evaluar la tasa de mutación que los microorganismos podrían sufrir bajo esta condición de resguardo. Para evitar la domesticación y mutación de bacterias (durante su resguardo), se ha intentado inactivar su metabolismo, mediante técnicas de resguardo conocidas como "métodos restringidos". Estos métodos se basan en la paralización del crecimiento bacteriano mediante la eliminación del agua disponible de la célula; donde se permite la

deseccación de bacterias en un soporte inerte y estéril. En este caso las bacterias se pueden colocar en soportes como papel filtro, piedra pómez (pumita), turba, bolitas de alginato e incluso sal gorda. Es importante destacar que la desecación en bolitas de alginato es un procedimiento bastante eficaz para preservar bacterias (Fages, 1990; Pravakaran & Hoti, 2008); donde las células son conservadas en tubos estériles, cerrados herméticamente y a una temperatura de entre 4°C y 18°C. La desecación en sal gorda, es un método usado para halobacterias (García & Uruburu, 2000); en el cual, las células se mezclan con una solución de sal gorda y se secan aprovechando la higroscopicidad de la sal, la desecación no es total, pero las células dejan de multiplicarse por el nivel insuficiente de agua disponible en el medio. En la turba, las bacterias pueden contener un poco de sustrato e incluso humedad, no obstante el tiempo en que las bacterias se mantienen es un periodo corto que a lo mucho abarca 6 meses (Bashan, 1998). En varios de los métodos de preservación a corto plazo el riesgo de contaminación celular es alto debido a que los microorganismos están expuestos a condiciones ambientales normales. En el caso específico de desecación, las células sufren estrés por oxidación y pérdida de agua (Potts, 1994), razón por la que el número de células viables disminuye notablemente, especialmente para microorganismos sensibles.

## *Preservación a mediano plazo*

Este es un método que requiere un laboratorio con una infraestructura costosa y el uso de ultracongeladores que conservan a las células a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El método conocido como “congelación” ha resultado muy fácil de desarrollar y muchos laboratorios en el mundo lo han elegido por su fácil manejo. Para preservar microorganismos por congelación, primero se cultiva al microorganismo en cuestión y se deja crecer hasta la fase estacionaria temprana, las células del cultivo se lavan o no con una solución tampón y después son adicionadas con un volumen equivalente de una suspensión que contiene una sustancia que deberá funcionar como protectora de las células a la congelación (Perry, 1995). Esa sustancia es conocida con el nombre de “crioprotector”. Los crioprotectores que se han explorado son variados y desafortunadamente no existe un crioprotector universal. Hay pocos trabajos que exploren el uso adecuado de un crioprotector para una especie bacteriana en específico, no obstante, numerosos datos se tienen gracias a la experiencia de diversos laboratorios, que en conjunto han generado un gran conocimiento acerca de la forma efectiva para preservar un microorganismo y del tipo de crioprotector que se debe usar (Hubálek, 2003). Si recordamos que desconocemos a la mayoría de especies bacterianas que habitan en un ambiente, podemos inferir que se conoce poco referente a las formas para preservar microorganismos por congelación. Solo por mencionar un dato relevante, aún cuando

muchos laboratorios usan glicerol (25-35%) para preservar a sus microorganismos por congelación, el crioprotector con mas datos de efectividad reportado para un gran número de especies es el dimetil sulfóxido (Tabla 1). De hecho, algunas veces se fracasa en preservar a un microorganismo por congelación. Esto podría ser debido a que las bacterias mueren si no se usa el protector adecuado. Algunos protectores que se han usado para preservar efectivamente a bacterias en congelación se muestran en la tabla 1. Como podrá notarse la mayoría de ellos son sustancias que se han reportado como solutos compatibles (Hubálek, 2003). Sin estos compuestos podrían formarse agujas de agua y también se genera un estrés osmótico debido a la baja disponibilidad de agua que ocurre durante el proceso de congelación (Perry, 1995). Además de la infraestructura, el método por congelación, requiere de un gasto energético alto y constante para mantener las temperaturas tan bajas que son deseadas. No obstante, la ventaja más grande de este método es que es muy rápido y fácil de llevar a cabo. Se especula que las células bacterianas podrían mutar durante el proceso de congelación, por ejemplo, algunos microbiólogos aseguran que las cepas resguardadas por congelación, pierden algunas características importantes; como la capacidad de fijar nitrógeno. Sin embargo, el fenómeno de mutación ha sido reportado solo en algunos trabajos, como ocurre para *Saccharomyces cerevisiae* cuando se congela lentamente (Stoycheva *et al.*, 2007).

# Artículos

**Tabla 1.** Crioprotectores usados para el resguardo de Microorganismos bajo condiciones de congelación.

Crioprotector	Bacterias efectivamente preservadas
Dimetil sulfóxido (DMSO)	<i>Mycobacterium phlei</i> (Aithal & Brodie, 1975), <i>Enterobacter aerogenes</i> (Postgate & Hunter, 1961), Bacterias metanotróficas (Green & Woodford, 1992), <i>Spirillum volutans</i> (Pauley & Krieg, 1974), <i>Holospira undulate</i> (Millot & Kaltz, 2006), <i>Anaplasma marginale</i> (Love, 1972), Levaduras (Breierová & Kokcová-Kratochvilová, 1992), Mycoplasmas (Raccach <i>et al.</i> , 1975), <i>Rickettsiae</i> , <i>Chlamydiae</i> y <i>Anaplasma phagocytophila</i> (Hubálek, 2003).
DMSO + Glicerol	<i>Escherichia coli</i> (Markarian <i>et al.</i> , 2004) y <i>Leptospira interrogans</i> (Palit <i>et al.</i> , 1986).
DMSO + Leche descremada	Hongos no filamentosos (Juarros <i>et al.</i> , 1993).
DMSO + Sacarosa	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> (Panoff <i>et al.</i> , 2000).
Dietyl sulfóxido (Et <sub>2</sub> SO)	<i>Escherichia coli</i> (Markarian <i>et al.</i> , 2004).
Glicerol	<i>Escherichia coli</i> (Hubálek, 2003), Mycoplasmas (Raccach <i>et al.</i> , 1975), y <i>Pseudomonas putida</i> (Pseudomonas Center, EEZ-CSIC), <i>Burkholderia unamae</i> , <i>Sphingomonas</i> sp., <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> , <i>Bradyrhizobium</i> sp., <i>Azospirillum</i> sp. and <i>Klebsiella</i> sp. (nuestro laboratorio, CICM-ICBUAP).
Sacarosa	<i>Enterobacter aerogenes</i> (Postgate & Hunter, 1961), <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> (Chavarri <i>et al.</i> , 1988), <i>Lactobacillus delbrueckii</i> (Panoff <i>et al.</i> , 2000), <i>Clamylidia</i> spp. (Prentice & Farrant, 1977), <i>Micoplasma</i> spp., <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Anaplasma marginale</i> , <i>Proteus</i> y <i>Micrococcus</i> sp. (Hubálek, 2003).
Glucosa	<i>Enterobacter aerogenes</i> (Postgate & Hunter, 1961)
Glucosa + Sacarosa	<i>Anaplasma marginale</i> (Hubálek, 2003) y <i>Escherichia coli</i> (Ray <i>et al.</i> , 1975).
Lactosa	<i>Streptococcus lactis</i> ssp. (Chavarri <i>et al.</i> , 1988), <i>Escherichia coli</i> (Hubálek, 2003) y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> (Panoff <i>et al.</i> , 2000).
Polivinilpirrolidona (PVP)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (Nash <i>et al.</i> , 1963), <i>Methylomonas</i> , <i>Methylococcus</i> y <i>Methylocistis</i> (Green & Woodford, 1992).
PVP + ác. L-glutámico	<i>Campylobacter pylori</i> (Owen <i>et al.</i> , 1989).
PVP + ficoll	<i>Anaplasma</i> spp. (Standfast & Jorgensen, 1997).
Leche descremada	<i>Escherichia coli</i> (Hubálek, 2003), <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Kim & Kubica, 1972), <i>Pasteurella multocida</i> (Watco & Heddleston, 1966), <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Corynebacterium flaccumfaciens</i> , <i>Erwinia amylobora</i> , <i>Pseudomonas morsprunorum</i> y <i>Xanthomonas corylina</i> (Moore & Carlson, 1974).
Óxido de polietileno	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Serratia marcescens</i> y <i>Escherichia coli</i> (Hubálek, 2003).

## Preservación a largo plazo (liofilización)

La liofilización se usa extensamente para extraer agua de alimentos, proteínas y

sustancias de interés farmacéutico (Ratti, 2001; Roy & Gupta, 2004; Tag, 2004), para conseguir su estabilidad a temperatura ambiente. No obstante, esta metodología es

muy efectiva para la preservación de células, en un estado viable y de dormancia, de miembros de los dominios Eucaria (Crowe *et al.*, 2003; Ryan and Smith, 2007) y Bacteria (Leslie *et al.*, 1995; Perry, 1995; Redway & Lapage, 1974). Sin embargo, los miembros del dominio Arquea se resguardan mediante una metodología alternativa conocida como “deseccación líquida”, debido a que son sensibles a la desecación rápida experimentada en la liofilización (Sakane *et al.*, 1992). Debe de tomarse en consideración que para incrementar la supervivencia de las células que se resguardan bajo condiciones de liofilización, se ha implementado el uso de sustancias que actúan como protectoras (lio-protectores) y se tiene que explorar la sustancia que protege a la bacteria que se desea resguardar (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006).

La liofilización consiste fundamentalmente en extraer por sublimación, bajo condiciones de alto vacío, el agua de las células congeladas; que pasa directamente a un estado de vapor debido a que no hay presión molecular que lo impida. En este método, las muestras que contienen la suspensión de microorganismos, son previamente congeladas (usando nitrógeno líquido) e inmediatamente expuestas al vacío. El vapor de agua extraído es atrapado por un condensador de refrigeración que opera a -110°C. El vacío debe ser casi absoluto (menos de 10mTorr; 10µm de Hg), lo que provoca la evaporación del hielo con la consiguiente pérdida de calor que se produce en el proceso. Por lo tanto, un liofilizador necesita una bomba de alto vacío, un

condensador y aditamentos (Fig. 1) para el funcionamiento principal.



**Fig. 1.** Liofilizador de laboratorio. Los frascos conectados a la cámara de vacío contienen tubos con bacterias en proceso de liofilización (a). También se muestra la ubicación del condensador (b) y la bomba de vacío (c).

No obstante, también se requiere de una bomba adicional y un accesorio de entradas múltiples si se desean elaborar ampollitas al vacío que portarán las bacterias que se desean preservar. Después de la “deseccación” de las células bacterianas, los microorganismos se mantienen en viales individuales o en ampollas y bajo condiciones de vacío o se les aplica un gas inerte. Una vez que las bacterias se liofilizan, estas pueden permanecer en un lugar fresco a una temperatura que oscile entre los 15 a los 25°C, esto significa guardar a las muestras liofilizadas a temperatura ambiente, lo que reduce en gran medida los costos energéticos que se requieren para mantener las bajas temperaturas de un ultracongelador. Así a largo plazo la liofilización resulta menos

costosa que la ultracongelación. Además, la ventaja máxima que representa liofilizar una cepa bacteriana, es que es una manera de preservar a largo plazo; se dice que las muestras pueden conservarse por más de 25 años. El punto limitante del método es que aún hay poco conocimiento en la forma adecuada para preservar a las bacterias por este método y de acuerdo con los datos con que se cuenta no existe un lio-protector universal para todas las cepas bacterianas y se debe explorar la supervivencia a la liofilización para cada caso particular (Morgan *et al.*, 2006). Sin embargo, se han encontrado algunas sustancias protectoras muy efectivas como la hidroxietilcelulosa (Manzanera *et al.*, 2002; Manzanera *et al.*, 2004) y los disacáridos (trehalosa, lactosa, maltosa y sacarosa) (Leslie *et al.*, 1995; Muñoz-Rojas *et al.*, 2006; Palmfeldt *et al.*, 2003). Se propone que los disacáridos protegen a las células al sustituir a las moléculas de agua, durante el proceso de liofilización (Leslie *et al.*, 1995; Crowe *et al.*, 2003). De esta forma las células no pasan de su estado de cristal líquido a la fase de gel y mantienen su estructura celular intacta (Leslie *et al.*, 1995), lo cual posibilita a que la membrana no sufra rupturas durante el proceso de liofilización y/o rehidratación.

Algunas bacterias que se han conservado eficientemente mediante liofilización están listadas en la tabla 2. La mayoría de ellas se han preservado usando protectores de forma individual como algunos polialcoholes o

azúcares y pocas veces usando mezclas de ellos. Quizás habrá que probar algunas mezclas complejas con los protectores más efectivos para obtener un lio-protector adecuado que sea capaz de proteger a cualquier célula bacteriana del proceso de liofilización. La combinación de lactosa y trehalosa ha resultado importante para la protección de bacterias probióticas (Pehkonen *et al.*, 2008). Además, la leche desnatada al 20% es medianamente eficiente para preservar a algunas bacterias mediante liofilización (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006, Redway and Lapage, 1974).

La preservación adecuada de una cepa bacteriana es necesaria para resguardar el potencial biotecnológico que cada una alberga en su genoma. La disponibilidad de secuencias de genomas completos facilita los estudios de genómica y proteómica, no obstante muchos de esos estudios requiere de una gran colección de mutantes suficiente para establecer la relación inequívoca entre los genes y sus funciones, para identificar regulones y para determinar jerárquicamente los procesos transcripcionales. Así se ha construido una banca de mutantes de *Pseudomonas putida* KT2440 para facilitar los estudios genómicos de este microorganismo (Duque *et al.*, 2007). La preservación a largo plazo de la colección de mutantes es muy importante y la liofilización es una metodología adecuada usada en las colecciones de cultivos microbianos. No



# Artículos

**Tabla 2.** Bacterias preservadas por liofilización y tasa de supervivencia (BSR).

Bacteria	Lio-protector usado	BSR	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	Trehalosa	98	Leslie <i>et al.</i> , 1995.
	Sacarosa	97.36	
	Sin protector	88.49	
<i>Bacillus thuringensis</i>	Trehalosa	97.4	Leslie <i>et al.</i> , 1995.
	Sacarosa	96.23	
	Sin protector	91.10	
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Sin protector (solo agua)	67.32	Palmfeldt <i>et al.</i> , 2003
	Sacarosa	87.40	
	Leche descremada	76.55	
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Trehalosa	85	Muñoz-Rojas <i>et al.</i> , 2006
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	Trehalosa	91.5	Muñoz-Rojas <i>et al.</i> , sin publicar.
	Sin protector	31.36	
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI5 <sup>T</sup>	Trehalosa	95.14	Muñoz-Rojas <i>et al.</i> , sin publicar
	Sin protector	80	
<i>Burkholderia unamae</i> MTI-641	Trehalosa	97	Muñoz-Rojas <i>et al.</i> , sin publicar.
	Sin protector	66	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Suero de caballo	42.85	Redway & Lapage, 1974
	Inositol 5% + Suero de caballo	85.71	
	Trehalosa 10% + Suero de caballo	85.71	
<i>Burkholderia tropica</i> MTo-293	Trehalosa	93.40	Muñoz-Rojas <i>et al.</i> , sin publicar.
	Sin protector	63.67	

La BSR mostrada, fue calculada para esta revisión con los datos de los trabajos publicados en cada caso y de acuerdo a Muñoz-Rojas y colaboradores (2006);  $BSR = \text{Log} (1 + \text{No. UFC/ml DD}) \times 100 / \text{Log} (\text{No. UFC/ml AD})$ . DD=después de la desecación, AD=Antes de la desecación.

obstante, en la actualidad no es el método más utilizado para preservar bacterias en la mayoría de laboratorios de investigación.

*Un banco de cepas mutantes de Pseudomonas putida* KT2440, resguardado por congelación y liofilización.

*P. putida* KT2440 portadora del plásmido TOL, es una bacteria de gran importancia agro-biotecnológica e industrial, que usa una amplia gama de compuestos orgánicos como fuente de carbono; algunos ejemplos incluyen: tolueno, benzoatos, aminoácidos, compuestos aromáticos, entre otros (Arias-Barrau *et al.*, 2004; Ramos *et al.*, 1994; Revelles *et al.*, 2004). Esta bacteria coloniza

bien a la raíz de diversas plantas (Molina *et al.*, 2000) proponiéndose como modelo de rizoremediación como se ha planteado en otras bacterias (Böltner *et al.*, 2008). El genoma completo de esta bacteria esta secuenciado (Nelson *et al.*, 2002) y disponible en la base de datos pública NCBI.

En la actualidad se tiene especial interés en descubrir tanto a nuevas especies bacterianas, así como en estudiar en detalle la función que desempeñan los genes que conforman a algunas bacterias de interés. Una banca de mutantes “no repetidas” de *P. putida* KT2440 ha sido construida para estudiar la función a detalle de cada una de ellas (Duque *et al.*, 2007). Las mutantes se

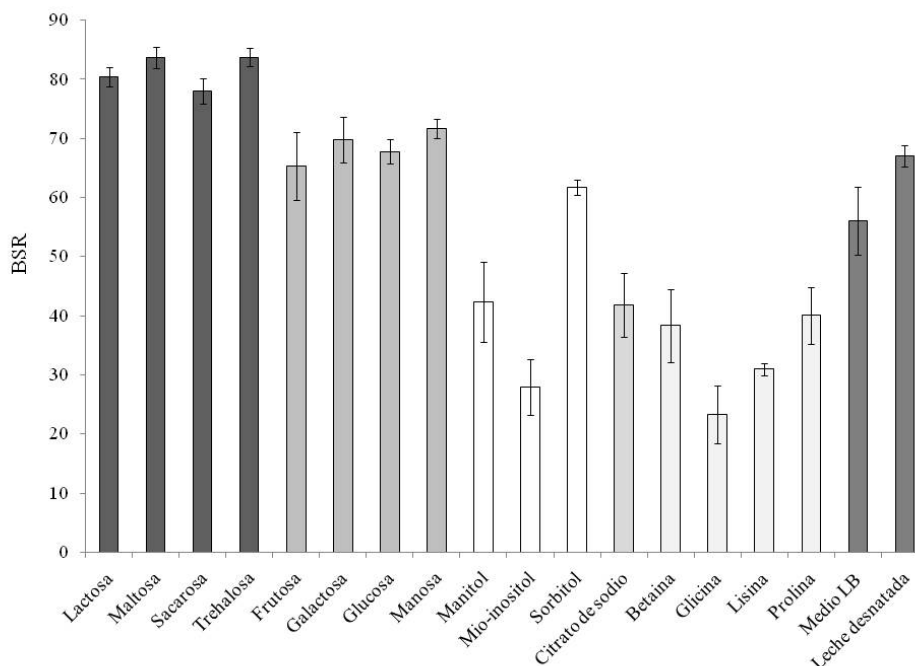
han obtenido mediante estrategias de mutagénesis al azar, conjugando el plásmido pUT-Km, que porta a los transposones miniTn5, desde una cepa donadora hasta la cepa receptora (de Lorenzo *et al.*, 1990). Los transposones miniTn5 son insertados en distintas regiones del genoma de dicha bacteria y ordenando los numerosos clones mutantes con un robot picacolonia, "Genetix Qpix2", se plantea generar una genoteca completa con mutantes Knock-out e intergénicos para cada uno de los genes que conforman el genoma de la bacteria mencionada (Duque *et al.*, 2007). Los mutantes generados son conservados por ultracongelación en viales a -80° C hasta su uso. Posteriormente, se procede a la identificación de las distintas clonas mutantes mediante secuenciación del gen mutado usando oligonucleótidos específicos del miniTn5 y otros oligonucleótidos denominados arbitrarios (Ramos-González *et al.*, 2006). Con los estudios de secuenciación se han podido discriminar las mutantes repetidas.

La preservación eficiente de cada mutante diferente, identificada por secuenciación, se lleva a cabo mediante liofilización. En un estudio donde se evaluó la capacidad de diversas sustancias para proteger a *P. putida* KT2440 de la liofilización, se observó que esta bacteria sobrevive adecuadamente a la liofilización cuando es protegida con disacáridos (Fig. 2) (Muñoz-

Rojas *et al.*, 2006). Bajo estas condiciones la viabilidad de la bacteria puede mantenerse durante 4 años, no obstante no se evaluaron periodos mayores para conocer la estabilidad que otorgan los disacáridos para preservar las células a largo plazo. Por esta razón, la forma habitual de preservar el banco de mutantes de *P. putida* KT2440 se realiza usando myo-inositol al 5% (>25 años), debido a que este compuesto otorga una adecuada estabilidad de las células a largo plazo. Sin embargo, el número de células viables es menor respecto al observado por disacáridos (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006). Estudios posteriores serán requeridos para conocer estrategias mejoradas para preservar esta especie bacteriana, quizás una mezcla de trehalosa con myo-inositol serán adecuadas para una preservación efectiva a largo plazo.

En la actualidad la colección de mutantes de *Pseudomonas putida* KT2440, realizada mediante la inserción al azar de los transposones mini Tn5-Km, posee más de 3000 mutantes independientes, cuyos genes mutagenizados han sido secuenciados y caracterizados. Por ejemplo se han identificado 68 genes esenciales para el crecimiento de *P. putida* KT2440 en medio mínimo MM9-glucosa (Molina-Henares *et al.*, 2010). Además dentro de la colección de mutantes se han identificado genes, cuyo estudio ha contribuido a anotar

# Artículos



**Fig. 2.** Supervivencia de *P. putida* KT2440 a la liofilización (BSR) (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006) usando diversos protectores. Se destaca que los disacáridos protegen mejor a esta bacteria, respecto a los otros compuestos usados como protectores.

correctamente a 30 genes (Duque *et al.*, 2007); anotados anteriormente de forma

errónea o sin función. La tabla 3 muestra algunos ejemplos.

**Tabla 3.** Algunas cepas mutantes de la colección de *P. putida* KT2440 cuya anotación previa ha sido modificada tras los estudios fisiológicos y genéticos de los mismos.

Nombre de mutante	Gen mutagenizado	Anotación previa	Referencia
PP0383 davB	Lisina monooxigenasa	Triptófano 2-monooxigenasa	Revelles <i>et al.</i> , 2005.
PP4615 ddcA	Proteína de membrana implicada en colonización de semillas	Proteína hipotética conservada	Espinosa-Urgel <i>et al.</i> , 2000.
PP0691 proB	Glutamato-β-semialdehido deshidrogenasa	Glutamato 5-Quinasa	Ramos-Díaz & Ramos, 1998.
PP1530 dapD	Tetrahidrodipicolinato succinilasa	2,3,4,5-tetrahidropiridina-2-carbosilato	Molina-Henares <i>et al.</i> , sin publicar
PP1588 dapC	N-succinil diaminopimelato aminotransferasa	Aminotransferasa clase I	Molina-Henares <i>et al.</i> , sin publicar

*Bacterias "no cultivables" y su preservación*

El término de bacteria "no cultivable" se atribuye a aquellas bacterias que se han

detectado en un ambiente, mediante técnicas moleculares, pero que no ha sido posible cultivarlas con los métodos clásicos disponibles. Entonces ¿cómo detectar bacterias no cultivables en un ambiente? Eso se ha respondido mediante el uso de metodologías moleculares modernas (Amann *et al.*, 1995; Hughes *et al.*, 2001). Por ejemplo, la técnica de "Hibridación *in situ*" (Moter & Göbel, 2006), microarreglos (Bochner, 2009; Sanguin *et al.*, 2006), DGGE, TTGE (Vásquez *et al.*, 2001), clonación y secuenciación (Yang & Zhang, 2007). Estas técnicas, van dirigidas para amplificar, clonar y/o detectar por hibridación a el gen 16S rDNA (un gen altamente conservado y ampliamente estudiado). La base de datos de este gen es la más grande de entre los genes conservados que pueden estudiarse (Baker *et al.*, 2003), lo que facilita la identificación de bacterias sin el uso de técnicas de cultivo. Sin embargo, la eficiencia de la técnica depende de la capacidad de las sondas o los oligonucleótidos para pegarse al DNA genómico de las bacterias y en sí de la secuencia de las sondas (Bouvier & Giorgio, 2003). Existen dos problemas adicionales, no existen oligonucleótidos totalmente universales que logren amplificar a todos los genes 16S rDNA (Baker *et al.*, 2003), ya que se ha observado que entre más se conoce la diversidad de bacterias menos regiones conservadas en la secuencia de un gen ribosomal se encuentran. Además, las bacterias podrían contener varios genes ribosomales que muchas veces han evolucionado en distintos caminos (Acinas *et al.*, 2004; Klappenbach *et al.*, 2001), lo que

podría hacer más difícil la interpretación de resultados. No obstante, el conocimiento actual de bacterias "no cultivables" mediante la secuenciación del gen 16S rDNA se ha incrementado, designándolas como unidades taxonómicas operacionales (OTUs de sus siglas en inglés) (Hughes *et al.*, 2001; Yang & Zhang, 2007); debido a que la secuencia posee una variación suficiente para definir un taxón bacteriano, a pesar de no haber sido cultivados. Es importante destacar que la mayoría de las bacterias permanecen sin ser cultivadas y por lo tanto no se conoce como ellas pueden ser resguardadas.

¿Podemos preservar a las bacterias no cultivables? La respuesta a esta pregunta significaría un salto de frontera que debe explorarse. No obstante es concebible pensar que si se usa un protector directamente sobre bacterias del suelo para posteriormente someter la muestra a liofilización, solo aquellas bacterias que sean compatibles con el protector serán aseguradas en su viabilidad. Una posibilidad para preservar el número máximo de especies bacterianas será la de someter una muestra a resguardo en presencia de diferentes protectores (de forma independiente) o bien explorar la protección que ofrezcan mezclas complejas a la preservación de bacterias por liofilización. Un método para preservar bacterias no cultivables, permitiría que las bacterias presentes en muestras procedentes de diversos ambientes, permanezcan viables y en espera de ser estudiadas; lo cual significaría un banco alternativo para estudios de metagenómica disponible para

analizarse en el momento oportuno. En la actualidad los estudios de metagenómica se han realizado a partir de ambientes naturales como el suelo (Cardenas & Tiedje, 2008; Rajendhran & Gunasekaran, 2008), pero aquí proponemos resguardar los microorganismos del ambiente para su posterior análisis, en función del tipo de muestra ambiental.

## CONCLUSIONES

En la presente revisión se plantearon las diferentes estrategias para la preservación bacteriana, ya sea a corto, mediano y largo plazo. Las formas de preservación variarán dependiendo de las condiciones de laboratorio (infraestructura) y del microorganismo en cuestión. Cuanto más conozcamos en relación a la supervivencia de las distintas cepas bacterianas a condiciones de congelación, desecación y liofilización, mejor entenderemos las alternativas adecuadas para preservar al microorganismo en cuestión, lo que será fundamental para el establecimiento de un banco de cepas con alto valor biotecnológico. La supervivencia y el mantenimiento de las características (fenotípicas y genotípicas) de las bacterias son primordiales para una correcta preservación; esto indirectamente asegurará el mantenimiento del gran potencial biotecnológico que las bacterias resguardan en sus genomas. La preservación bacteriana es fundamental no solo para el resguardo de una cepa con potencial biotecnológico, también es importante para el estudio futuro en la búsqueda de nuevas funciones de los genes de una bacteria de interés. En esta revisión

se abordó el ejemplo de un banco de cepas mutantes de *Pseudomonas putida* KT2440, resguardado por congelación y liofilización; el cual contiene más de 3000 cepas mutagenizadas en diversos genes y cuyas mutantes se están estudiando a profundidad para la elucidación de la función de los genes mutagenizados. A pesar de que la preservación de *P. putida* mediante liofilización ha sido exitosa (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006; Duque *et al.*, 2007), debe considerarse el estudio específico, para encontrar las condiciones adecuadas para el resguardo de otras especies bacterianas benéficas. Un estudio de frontera será el resguardo de bacterias viables “no cultivables” presentes en muestras de diversos ambientes y la banca de muestras con microorganismos resguardados podría servir para estudios de metagenómica. La presente revisión pone de manifiesto el todavía largo camino por recorrer hacia el conocimiento del resguardo de bacterias y sus potenciales beneficios.

## AGRADECIMIENTOS

Yolanda Elizabeth Morales-García es becaria VIEP-BUAP y PROMEP (BUAP-PTC-116), Osvaldo Rodríguez-Andrade es becario CONACYT, por lo que agradecemos el apoyo de dichas instituciones.

## REFERENCIAS

Acinas SG, Marcelino LA, Klepac-Ceraj V & Polz MF (2004) Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *J. Bacteriol.* 186: 2629-2635.

# Artículos

- Aithal HN, Kalra VK and Brodie AF (1975) Alteration of *Mycobacterium phlei* membrane structure by freezing and thawing: reversal by heating. *Arch. Biochem. Biophys.* 168: 122-132.
- Amann RI, Ludwig W & Schleifer K-H (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169.
- Arias-Barrau E, Olivera ER, Luengo JM, Fernández C, Galan B, García JL, Díaz E & Miñambres B (2004) The homogentisate pathway: a central catabolic pathway involved in the degradation of L-phenylalanine, L-tyrosine, and 3-hydroxyphenylacetate in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 186: 5062-5077.
- Bashan Y (1998) Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.* 16: 729-770.
- Baker GC, Smith JJ & Cowan DA (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods* 55: 541-555.
- Battistuzzi FU, Feijao A & Hedges SB (2004) A genomic timescale of prokaryote evolution: insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land. *BMC Evol. Biol.* 4: 44.
- Bloemberg GV & Lugtemberg BJJ (2001) Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 343-350.
- Bochmer BC (2009) Global phenotypic characterization of bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 33: 191-205.
- Böltner D, Godoy P, Muñoz-Rojas J, Duque E, Moreno-Morillas S, Sánchez L & Ramos JL (2008) Rhizoremediation of lindane by root-colonizing *Sphingomonas*. *Microbial Biotechnol.* 1: 87-93.
- Bouvier T & Giorgio PA (2003) Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence *in situ* hybridization (FISH): a quantitative review of published reports. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44:3-15.
- Breierová E & Cocková-Kratochvilová A (1992) Cryoprotective effects of yeast extracellular polysaccharides and glycoproteins. *Cryobiology* 29:385-390.
- Broadbent JR, McMahon DJ, Welker DL, Oberg CJ & Moineau S (2003) Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: A review. *J. Dairy Sci.* 86: 407-423.
- Cardenas E & Tiedje JM (2008) New tools for discovering and characterizing microbial diversity. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19:544-549.
- Chavarri FJ, De Paz M & Nueez M (1988) Cryoprotective agents for frozen concentrated starters from non-bitter *Streptococcus lactis* strains. *Biotechnol. Lett.* 10: 11-16.
- Chemier JA, Fowler ZL, Koffas MA & Leonard E (2009) Trends in microbial synthesis of natural products and biofuels. *Adv Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 76: 151-217.
- Cooper VS (2002) Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. X. Quantifying the fundamental and realized niche. *BMC Evol. Biol.* 2: 12.

# Artículos

- Crowe JH, Tablin F, Wolkers WF, Gousset K, Tsvetkova NM & Ricker J (2003) Stabilization of membranes in human platelets freeze-dried with trehalose. *Chem. Phys. Lipids* 122: 41-52.
- Curtis TP, Sloan WT & Scannell JW (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 10494-10499.
- De Lorenzo V, Herrero M, Jakubzik U & Timmis KN (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* 172: 6568-6572.
- Duque E, Molina-Henares AJ, de la Torre J, Molina-Henares MA, del Castillo T, Lam J & Ramos JL (2007) Towards a genome-wide mutant library of *Pseudomonas putida* strain KT2440. In: *Pseudomonas*. Ramos JL & Filloux A (eds). Netherlands, Springer. pp. 227-51.
- Espinosa-Urgel M, Salido A & Ramos JL (2000) Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *J. Bacteriol.* 182: 2363-2369.
- Fages J (1990) An optimized process for manufacturing an *Azospirillum* inoculant for crops. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 473-478.
- García MD & Uruburu F (2000) La conservación de cepas microbianas. *SEM* 30: 12-16.
- Green PN & Woodford SK. Preservation studies on some obligately methanotrophic bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 14: 158-162.
- Hubálek Z (2003) Protectans used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* 46: 205-229.
- Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH, Bohannan JM (2001) Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4399-4406.
- Juarros E, Tortajada C, García MD & Uruburu F (1993) Storage of stock cultures of filamentous fungi at -80 degrees C: effects of different freezing-thawing methods. *Microbiología* 9: 28-33.
- Kerr RA (1997) Life goes to extremes in the deep earth –and elsewhere? *Science* 276: 703-704.
- Kim TH & Kubica GP (1972) Long term preservation and storage of mycobacteria. *Appl. Microbiol.* 24: 311-317.
- Klappenbach JA, Saxman PR, Cole JR & Schmidt TM (2001) RrnDb: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Res.* 29: 181-184.
- 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.
- Liao C-H & Shollenberger LM (2003) Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline. *Lett. Appl. Microbiol.* 37: 45-50.
- Love JN (1972) Cryogenic preservation of *Anaplasma marginale* with dimethylsulfoxide. *Am. J. Vet. Res.* 33: 2557-2560.

# Artículos

- Lucy M, Reed E & Glick BR (2004) Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 86: 1-25.
- Lugtemberg B & Kamilova F (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541-556.
- Manzanera M, García de Castro A, Tondervik A, Rayner-Brandes M, Strøm AR & Tunnacliffe A (2002) Hydroxyectoine is superior to trehalose for anhydrobiotic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4328-4333.
- Manzanera M, Vilchez S & Tunnacliffe A (2004) High survival and stability rates of *Escherichia coli* dried in hydroxyectoine. *FEMS Microbiol. Lett.* 233: 347-352.
- Markarian SA, Bonora S, Bagramyan KA & Arakelyan VB (2004) Glass-forming property of the system diethyl sulphoxide/water and its cryoprotective action on *Escherichia coli* survival. *Cryobiology* 49: 1-9.
- Millot L & Kaltz O (2006) Cryopreservation of *Holospira undulate*, a bacterial parasite of the ciliate *Paramecium caudatum*. *Cryobiology* 52: 161-165.
- Molina L, Ramos C, Duque E, Ronchel MC, García JM, Wyke L & Ramos JL (2000) Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biol. Biochem.* 32:315-321.
- Molina-Henares MA, de la Torre J, García-Salamanca A, Molina-Henares AJ, Herrera MC, Ramos JL & Duque E (2010) Identification of conditionally essential genes for growth of *Pseudomonas putida* KT2440 on minimal medium through the screening of a genome-wide mutant library. *Environ. Microbiol.* 12:1468-1485.
- Moore LW & Carlson RV (1974) Liquid nitrogen storage of phytopathogenic bacteria. *Phytopathology* 65: 246-250.
- Morales-García YE, Herrera MC & Muñoz-Rojas J (2007) Cloranfenicol, un antibiótico clásico como alternativa en el presente. *Rev. Mex. Ciencias Farm.* 38: 58-69.
- Morgan CA, Herman N, White PA & Vesey G (2006) Preservation of micro-organisms by drying; a review. *J. Microbiol. Methods* 66: 183-193.
- Moter A & Göbel UB (2000) Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 41: 85-112.
- Muñoz-Rojas J (2004) Bacteriocinas: una estrategia de competencia microbiana propuesta como alternativa de antibióticos dirigidos para el futuro humano. In: *Microbios en línea*. Martínez-Romero E & Martínez-Romero J (eds). Cuernavaca, Morelos, México, Asociación Mexicana de Microbiología, capítulo 3. Disponible en: [http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO\\_03/Capitulo03.pdf](http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_03/Capitulo03.pdf)
- Muñoz-Rojas J, Bernal P, Duque E, Godoy P, Segura A & Ramos JL (2006) Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 472-477.



# Artículos

- Nash T, Postgate JR, Hunter JR (1963) Similar effects of various neutral solutes on the survival of *Aerobacter aerogenes* and of red blood cells after freezing and thawing. *Nature* 199: 1113.
- Nelson KE, Weinel C, Paulsen IT, Dodson RJ, Hilbert H, Martins dos Santos VAP, *et al.* (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 4: 799-808.
- Owen RJ, On SLW & Costas M (1989) The effect of cooling rate, freeze drying suspending fluid and culture age on the preservation of *Campylobacter pylori*. *J. Appl. Bact.* 66: 331-337.
- Pace NR (1996) New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. *AMS News* 62: 463-470.
- Pace NR (1997) A molecular view on microbial diversity and the biosphere. *Science* 276: 734-40.
- Palit A, Haylock LM & Cox JC (1986) Storage of pathogenic leptospires in liquid nitrogen. *J. Appl. Bact.* 61: 407-411.
- Palmfeldt J, Radström P & Hahn-Hägerdal B (2003) Optimisation of initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of *Pseudomonas chlororaphis*. *Cryobiology* 47: 21-29.
- Panoff J-M, Thammavongs B & Guéguen M (2000) Cryoprotectants lead to phenotypic adaptation to freeze-thaw stress in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CIP 101027T. *Cryobiology* 40: 264-269.
- Paul D, Pandey G, Pandey J & Jain RK (2005) Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. *TRENDS Biotechnol.* 23: 135-142.
- Pauley EH & Krieg NR (1974) Long-term preservation of *Spirillum volutans*. *Int. J. Syst. Bact.* 24: 292-293.
- Pehkonen KS, Roos YH, Miao S, Ross RP & Stanton C (2008) State transitions and physicochemical aspects of cryoprotection and stabilization in freeze-drying of *Lactobacillus rhamnosus* GC. *J. Appl. Microbiol.* 104: 1732-1743.
- Perry SF (1995) Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. *Methods Mol. Biol.* 38: 21-30.
- Postgate JR & Hunter JR (1961) On the survival of frozen bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 26: 367-378.
- Potts M (1994) Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Rev.* 58: 755-805.
- Pravakaran G & Hoti SL (2008) Immobilization in alginate as a technique for the preservation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for long-term preservation. *J. Microbiol. Methods* 72: 91-94.
- Prentice MJ & Farrant J (1977) Survival of chlamydiae after cooling to -196 °C. *J. Clin. Microbiol.* 6: 4-9.
- Raccach M, Rottem S & Razin S (1975) Survival of frozen mycoplasmas. *Appl. Microbiol.* 30: 167-171.
- Rajendhran J & Gunasekaran P (2008) Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. *Biotechnol. Adv.* 26: 576-590.

# Artículos

- Ramos-Díaz MA & Ramos JL (1998) Combined physical and genetic map of the *Pseudomonas putida* KT2440 chromosome. *J. Bacteriol.* 180: 6352-6363.
- Ramos-González MI, Campos MJ, Ramos JL & Espinosa-Urgel M (2006) Characterization of the *Pseudomonas putida* mobile genetic element ISPpu10: an occupant of repetitive extragenic palindromic sequences. *J. Bacteriol.* 188: 37-44.
- Ramos JL, Díaz E, Dowling D, de Lorenzo V, Molin S, O'Gara F, Ramos C & Timmis KN (1994) The behavior of bacteria designed for biodegradation. *Biotechnology* 12: 1349-1356.
- Ramos JL, González-Pérez MM, Caballero A & van Dillewijn P (2005) Bioremediation of polynitrated aromatic compounds: plants and microbes put up a fight. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16:275-281.
- Ratti C (2001) Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. *J. Food Eng.* 49: 311-319.
- Ray B, Souzu H & Speck ML (1975) Cryoprotection of *Escherichia coli* by penetrating and nonpenetrating cryopreservatives. *Cryobiology* 12: 553.
- Redway KF & Lapage SP (1974) Effect of carbohydrates and related compounds on the long-term preservation of freeze dried bacteria. *Cryobiology* 11: 73-79.
- Revelles O, Espinosa-Urgel M, Fuhrer T, Sauer U & Ramos JL (2005) Multiple and interconnected pathways for L-lysine catabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. *J. Bacteriol.* 187: 7500-7510.
- Revelles O, Espinosa-Urgel M, Molin S & Ramos JL (2004) The *davDT* operon of *Pseudomonas putida*, involved in lysine catabolism, is induced in response to the pathway intermediate delta-aminovaleric acid. *J. Bacteriol.* 186: 3439-3446.
- Riley MA & Wertz JE (2002) Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 117-37.
- Roy I & Gupta MN (2004) Freeze-drying of proteins: some emerging concerns. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 39: 165-177.
- Ryan MJ & Smith D (2007) Cryopreservation and freeze-drying of fungi employing centrifugal and shelf freeze-drying. *In: Methods in Molecular Biology*, vol. 368: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Second Edition. Day JG & Stacey GN (eds). Humana Press, Totowa, NJ.
- Sakane T, Fukuda L, Itoh T & Yokota A (1992) Long-term preservation of halophilic archaeobacteria and thermoacidophilic archaeobacteria by liquid drying. *J. Microbial Methods* 16: 281-287.
- Sanguin H, Remenant B, Dechesne A, Thioulouse J, Bogel TM, Nesme X, Moënne-Loccoz Y & Grundmann GL (2006) Potential of a 16S rRNA-based taxonomic microarray for analyzing the rhizosphere effects of maize on *Agrobacterium* spp. And bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4302-4312.
- Standfast NF & Jorgensen WK (1997) Comparison of the infectivity of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma centrale* for cattle after cryopreservation

# Artículos

- in either dimethylsulfoxide or polyvinylpyrrolidone. *Aust. Vet. J.* 75: 62-63.
- Stoycheva T, Venkov P & Tsvetkov Ts (2007) Mutagenic effect of freezing on mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cryobiology* 54: 243-250.
- Straight PD & Kolter R (2009) Interspecies chemical communication in bacterial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 99-118.
- Strom SL (2008) Microbial ecology of ocean biogeochemistry: a community perspective. *Science* 320: 1043-1045.
- Tang X & Pikal MJ (2004) Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharm Res.* 21: 191-200.
- Uruburu F (2003) History and services of culture collections. *Int. Microbiol.* 6: 101-103.
- Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K & Swings J (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Revs.* 60: 407-438.
- Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255: 571-586.
- Vásquez A, Ahrné S, Pettersson B & Molin G (2001) Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for identification of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus zae* and *Lactobacillus rhamnosus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 32: 215-219.
- Watko LP & Heddleston KL (1966) Survival of shell-frozen, freeze-dried, and agar slant cultures of *Pasteurella multocida*. *Cryobiology* 3: 53-55.
- Yang M-X & Zhang H-B (2007) Diversity of microorganisms in decaying maize stalks revealed by a molecular method. *J. Microbiol.* 45:367-370.