




Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas- Programa de Magíster en Ciencias Mención
en Microbiología



**Evaluación del efecto protector de osmoreguladores
sobre la actividad metabólica de bacterias antárticas y
patagónicas.**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias con Mención en
Microbiología.

KARINA BELEN GONZÁLEZ SAN MARTÍN
CONCEPCIÓN-CHILE
2016

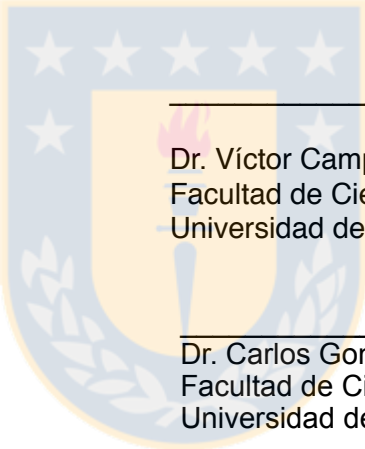
Profesor Guía: Dr. Miguel Martínez Poblete
Departamento de Microbiología,
Facultad de Ciencias Biológicas,
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dr. Miguel Martínez Poblete
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:



Dr. Víctor Campos Araneda
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

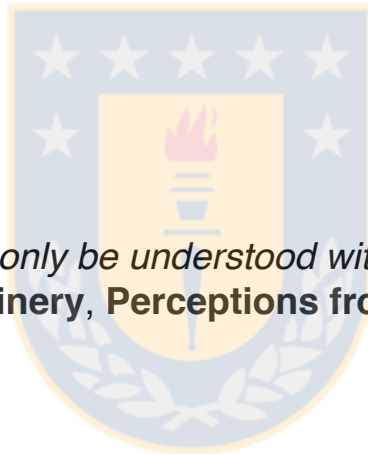
Dr. Carlos González Correa
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. José Becerra Allende
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dr. Víctor Campos Araneda
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

“Light can only be understood with the wisdom of darkness.”
— **Ka Chinery, Perceptions from the Photon Frequency**



AGRADECIMIENTOS.

Esta tesis fue realizada con financiamiento otorgado por los Proyecto FONDECYT 1100462, DIUC Patagonia 210.036.037-1SP y Enlace DIUC 214.036.04-1.0.

Quisiera agradecer a mis compañeros de laboratorio, en especial a Ruth Contreras y Evelyn Hernandez, por su paciencia y asesoramiento durante la realización de esta tesis. A Boris Parra y Matias Guerra por las discusiones sobre la vida de las bacterias, y en cuanto a citometría de flujo. Y a todos aquellos miembros del laboratorio que hicieron más ameno el trabajo diario. Y al profesor Miguel Martínez, por sus consejos y sus charlas motivadoras que me ayudaron a llegar a puerto con la tesis, además de forjar mi desarrollo como profesional y pensamiento científico.

Finalmente, quisiera agradecer a mi madre y abuelos, por su apoyo incondicional y paciencia a lo largo del desarrollo de esta tesis y de mi carrera científica. Y a todos aquellos familiares y amigos que me ayudaron con una palabra de aliento en las horas mas oscuras, en especial a Pedro Retamal por su apoyo incondicional.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VI
RESUMEN	VII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1.- Actividad metabólica en ambientes con baja temperatura y alta osmolaridad.....	2
1.2. Osmoprotectores.....	8
1.3.- Dormancia.....	10
2. HIPÓTESIS	12
3. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo general.....	13
3.2 Objetivos específicos.....	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS	14
4.1 Cepas bacterianas.....	14
4.2 Medio de cultivo.....	14
4.3 Caracterización de las cinéticas de crecimiento de las cepas bacterianas.....	15
4.4 Determinación de temperatura de estrés por frío.....	15
4.5 Concentración de NaCl inhibitoria del crecimiento.....	15
4.6 Caracterización de las cinéticas de crecimiento de las cepas bacterianas en concentración de NaCl.....	16
4.7 Evaluación de la actividad metabólica.....	16
4.8 Evaluación del efecto osmoprotector de GB sobre la actividad metabólica	17

4.8.1 Medición de la actividad metabólica frente a distintas concentraciones de GB.....	18
4.8.2 Efecto de NaCl sobre concentración celular bacteriana.....	18
4.9 Calibración de parámetros para citometría de flujo.....	18
4.9.1 Calibración de parámetros del citómetro de flujo utilizando esferas de Policarbonato.....	19
4.9.2 Evaluación de la actividad metabólica mediante citometría de flujo.	19
4.9.3 Evaluación del tamaño celular relativo mediante citometría de flujo.....	20
4.9.4 Evaluación de la complejidad citoplasmática relativa mediante citometría de flujo.....	21
4.10 Compensación automática.....	21
5. RESULTADOS	22
5.1 Cinéticas de crecimiento bacteriano.....	22
5.2 Concentraciones de NaCl inhibitorias del crecimiento.....	22
5.3 Cinética de crecimiento bacteriano en presencia de GB.....	28
5.4 Actividad metabólica con sal de tetrazolium WST-1.....	32
5.4.1 Actividad metabólica con sal de tetrazolium WST-1 en <i>Psychrobacter</i> sp. UDEC-A5.....	32
5.4.2 Actividad metabólica con sal de tetrazolium WST-1 en <i>Deinococcus</i> sp. UDEC-P1.....	33
5.5 Efecto de variación en la concentración de GB y NaCl sobre la actividad metabólica.....	35
5.5.1 Efecto de variación en la concentración de GB y NaCl sobre la actividad metabólica de <i>Psychrobacter</i> sp. UDEC A-5.....	35
5.5.2 Efecto de variación en la concentración de GB y NaCl sobre la actividad metabólica de <i>Deinococcus</i> sp. UDEC-P1.....	37
5.6 Efecto de NaCl sobre concentración celular bacteriana.....	38

5.6.1. Efecto de NaCl sobre concentración celular bacteriana de <i>Psychrobacter</i> sp. UDEC A-5.....	38
5.6.2. Efecto de NaCl sobre concentración celular bacteriana de <i>Deinococcus</i> sp. UDEC-P1.....	40
5.7 Análisis mediante citometría de flujo.....	41
5.7.1 Intensidad de Fluorescencia de <i>Psychrobacter</i> sp. UDEC-A5.....	41
5.7.2 Tamaño celular relativo de <i>Psychrobacter</i> sp. UDEC-A5.....	43
5.7.3 Complejidad Citoplasmática relativa de <i>Psychrobacter</i> sp. UDEC-A5.....	44
5.7.4 Intensidad de Fluorescencia de <i>Deinococcus</i> sp. UDEC-P1.....	46
5.7.5 Tamaño celular relativo de <i>Deinococcus</i> sp. UDEC-P1.....	47
5.7.6 Complejidad Citoplasmática relativa de <i>Deinococcus</i> sp. UDEC-P1	48
5.7.7 Intensidad de Fluorescencia de <i>Psychrobacter</i> sp. UDEC-A5.....	50
5.7.8 Intensidad de Fluorescencia de <i>Deinococcus</i> sp. UDEC-P1.....	51
6. DISCUSIÓN.....	53
6.1 Efecto osmolar de NaCl.....	53
6.2 GB, como osmoprotector de actividad metabólica.....	57
7. CONCLUSIONES.....	63
8. PROYECCIONES.....	64
9. REFERENCIAS.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cinética de crecimiento de <i>Psychrobacter</i> sp. UDEC-A5 en MSM +TP y NaCl.....	23
Figura 2. Cinéticas de crecimiento para <i>Psychrobacter</i> sp. UDEC-A5 en MSM +TP o R2A suplementado con NaCl.....	24
Figura 3. Cinética de crecimiento de <i>Deinococcus</i> sp. UDEC-P1 en MSM+TP y NaCl.....	25
Figura 4. Cinética de crecimiento de <i>Deinococcus</i> sp. UDEC-P1 en MSM+TP o R2A suplementado con NaCl.....	27
Figura 5. Cinética de crecimiento de <i>Psychrobacter</i> sp. UDEC-A5 en MSM +TP, suplementado con NaCl en presencia de 5mM de GB.....	29
Figura 6. Cinética de crecimiento de <i>Deinococcus</i> sp. UDEC-P1 en MSM+TP, suplementado con NaCl en presencia de 5mM de GB.....	30
Figura 7. Efecto de NaCl sobre la actividad metabólica de <i>Psychrobacter</i> sp. UDEC-A5a 20°C en MSM+TP.....	32
Figura 8. Efecto de NaCl sobre la actividad metabólica de <i>Deinococcus</i> sp. UDEC-P1 a 30°C en MSM+TP.....	33
Figura 9. Efecto de variación en la concentración de GB y NaCl sobre la actividad metabólica de <i>Psychrobacter</i> sp. UDEC A-5.....	35
Figura 10. Efecto de variación en la concentración de GB y NaCl sobre la actividad metabólica d <i>Deinococcus</i> sp. UDEC-P1.....	37
Figura 11. Efecto de NaCl sobre la actividad metabólica en distintos estados de crecimiento de <i>Psychrobacter</i> sp. UDEC A-5.....	39
Figura 12. Efecto de NaCl sobre la actividad metabólica en distintos estados de crecimiento de <i>Deinococcus</i> sp. UDEC P-1.....	40
Figura 13. Histogramas de los estados metabólicos de <i>Psychrobacter</i> sp. UDEC-A5 a 20°C y 10°C.....	42

Figura 14. Histogramas de los tamaños celulares de <i>Psychrobacter</i> sp. UDEC-A5 a 20°C y 10°C.....	43
Figura 15. Histogramas de la complejidad citoplasmática celular de <i>Psychrobacter</i> sp. UDEC-A5 a 20°C y 10°C.....	45
Figura 16. Histogramas de los estados metabólicos de <i>Deinococcus</i> sp. UDEC-P1 a 30°C y 20°C.....	46
Figura 17. Histogramas de los tamaños celulares relativos de <i>Deinococcus</i> sp. UDEC-P1 a 30°C y 20°C.....	47
Figura 18. Histogramas de la complejidad citoplasmática celular de <i>Deinococcus</i> sp. UDEC-P1 incubada a 30°C ó 20°C.....	49
Figura 19. Estado metabólico de <i>Psychrobacter</i> sp. UDEC-A5 a 20°C.....	50
Figura 20. Estado metabólico de <i>Deinococcus</i> sp. UDEC-P1 a 30°C.....	51



INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Crecimiento de <i>Psychrobacter</i> sp. UDEC-A5 y <i>Deinococcus</i> sp. UDEC-P1 en MSM+TP suplementado con NaCl.....	23
Tabla 2. Velocidad de crecimiento de <i>Psychrobacter</i> sp. UDEC-A5.....	25
Tabla 3. Velocidades de crecimiento <i>Deinococcus</i> sp. UDEC-P1.....	26
Tabla 4. Crecimiento de <i>Deinococcus</i> sp. UDEC-P1 y <i>Psychrobacter</i> sp. UDEC-A5 en MSM+TP suplementado con NaCl y GB.....	28
Tabla 5. Velocidad de crecimiento de <i>Psychrobacter</i> sp. UDEC-A5 en presencia de GB (5mM).....	30
Tabla 6. Velocidades de crecimiento <i>Deinococcus</i> sp. UDEC-P1 en presencia de GB (5mM).....	31



RESUMEN

En bacterias, la disminución de la actividad metabólica es una estrategia de supervivencia frente a ambientes desfavorables. Esta disminución del metabolismo se acentúa en medios con osmolaridad elevada. En estas condiciones la célula requiere de solutos compatibles, para recuperar la homeostasis celular y evitar daño macromolecular. El objetivo fue establecer si el osmoprotector GB permite mantener la actividad metabólica en *Deinococcus* sp. UDEC-P1 y *Psychrobacter* sp. UDEC-A5, en condiciones de shock osmótico por NaCl.

Las cepas se cultivaron en MSM, suplementado con elementos traza y piruvato 0,3g/L. La actividad metabólica de ambas cepas se determinó en microplacas utilizando sales de tetrazolium WST-1 (10µl/pocillo). *Deinococcus* sp. UDEC-P1 se cultivó a 30°C ó 20°C con 0.1 ó 0.25M de NaCl. *Psychrobacter* sp. UDEC-A5 fue cultivada a 20°C ó 10°C con 0.5 ó 1.0M de NaCl, en presencia y ausencia de glicina-GB para ambas cepas. Por citometría de flujo se evaluó la actividad metabólica, utilizando el kit BacLightRedoxSensor™ Green Vitality, con y sin glicina-GB (5mM) y se determinó el tamaño celular relativo y la complejidad citoplasmática. Adicionalmente se determinó la proporción de células en dormancia metabólica, con el mismo kit.

Los resultados mostraron que *Deinococcus* sp. UDEC-P1 fue más sensible que *Psychrobacter* sp. UDEC-A5 al efecto osmolar. Sin embargo, en ambas cepas, la adición de GB a los tratamientos con 0.1M ó 0.5M NaCl, respectivamente, mantuvo la actividad metabólica en niveles similares al control.

Sin embargo, la presencia de NaCl indujo un aumento del tamaño celular relativo en presencia o ausencia de GB sólo en *Deinococcus* sp. UDEC-P1. Por otra parte, ambas cepas aumentaron la proporción de células dormantes en

presencia de NaCl. En tanto que la adición de GB no modifica la proporción de células dormantes en la cepa *Deinococcus* sp. UDEC-P1, pero si las disminuye en *Psychrobacter* sp. UDEC-A5.



ABSTRACT

In bacteria, metabolic activity diminution is a survival strategy to face unfavorable environments. This decrease is enhanced under high osmolarity. Under these conditions, the cell requires compatible solutes to prevent cell damage and to recover macromolecular homeostasis. The aim of this work was to establish if the osmoprotector glycine-betaine maintained the metabolic activity in *Deinococcus* sp. UDEC-P1 and *Psychrobacter* sp. UDEC-A5, under osmotic shock by NaCl. Both strains were originally grown in saline medium supplemented with pyruvate 0.3g/L and trace elements (MSMTP). Later on, *Deinococcus* sp. UDEC-P1 was grown at 30°C or 20°C in MSMTP plus 0.1 or 0.25M NaCl. *Psychrobacter* sp. UDEC-A5 was also grown in MSMTP plus 0.5 or 1.0 M, but at 20°C or 10°C.

The metabolic activity of both strains was determined in microplates using sales tetrazolium WST-1 (10 uL/well). Later on, metabolic activity, relative cell size and cytoplasmic complexity of both strains was evaluated by flow cytometry using the BacLightRedoxSensor Vitality Green kit, with and without Glycine-betaine (5mM). In addition, the proportion of dormant cells was determined by the same kit.

The results obtained with WST-1 showed that the strain *Deinococcus* sp. UDEC-P1 was more susceptible than *Psychrobacter* sp. UDEC-A5 to the osmolar effect. However, in both strains, the addition of glycine-betaine to the treatments with 0.1M or 0.5M NaCl, respectively, maintained metabolic activity without significant differences to control. Similar results were obtained by flow cytometry, and they also showed that cytoplasmic complexity was increased by osmotic stress. Furthermore, *Deinococcus* sp. UDEC-P1 increased the relative cell size in presence of NaCl with or without glycine betaine. Moreover, the NaCl presence in both strains, increased the dormant cells proportion. However, the addition of GB to *Deinococcus* sp. UDEC-P1 didn't modify this proportion. By contrast in *Psychrobacter* sp. UDEC-A5 in GB presence decreased the proportion of dormant cells.

1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias se encuentran distribuidas de manera ubicua en el ambiente, incluyendo ambientes prístinos como aquellos en que pueden interactuar con el hombre. Los distintos ambientes en los que se desarrollan las bacterias poseen oscilaciones de nutrientes o iones, temperatura, pH, disponibilidad de agua, entre otros. Las oscilaciones de estos parámetros son consideradas como fenómenos de estrés, puesto que alteran el crecimiento y metabolismo microbiano (Lennon y Jones, 2011). Así, que para sobrevivir las bacterias dependen de su capacidad para detectar y responder de manera rápida a estos cambios ambientales. Estas respuestas a los cambios ambientales son transformados en estímulos físicos o químicos a través de vías de transducción, generando una cascada de señalización que regula funciones celulares, a partir de una respuesta a nivel de activación proteica o a través de la regulación genética (Rubiano-Labrador *et al.*, 2015).

El citoplasma bacteriano es un ambiente acuoso con densidad y cantidad de compuestos distribuidos de manera no uniforme. Estos constituyentes presentan formas y tamaños de variada magnitud, desde nanométricos (iones y metabolitos) a moléculas 10 veces mayores como proteínas, ribozomas, plásmidos, gránulos intracitoplasmáticos, y cromosoma bacteriano (Parry *et al.*, 2014). La regulación energética y metabólica de estos componentes citoplasmáticos, es la que mantiene el metabolismo de la célula bacteriana. (Aldridge y Rhee, 2014). En base a esto, los microorganismos deben controlar y regular sus constituyentes estructurales y fisiológicos, otorgándole adaptabilidad frente a cambios ambientales (Rhee *et al.*, 2011, Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2015). Dentro de las estrategias fisiológicas se Incluye la disminución del metabolismo, de manera reversible, como respuesta al estrés ambiental. (Aldridge y Rhee, 2014). En este estado de menor metabolismo la bacteria requiere bajos aportes de energía y recursos, lo que le permite prolongar su sobrevivencia en este estado metabólico (Kaprelyants, 1993).

1.1 Actividad metabólica en ambientes con baja temperatura y alta osmolaridad.

Se ha descrito como estrés térmico, la disminución de temperatura de 10 a 15 °C, con respecto a la temperatura de máxima velocidad de crecimiento para la célula bacteriana (Hébraud y Potier, 1999). Puesto que, la temperatura es un factor que modifica la eficiencia de los procesos metabólicos celulares y por tanto, la expresión de genes (Kortmann y Narberhaus, 2012). No obstante, diferentes estudios han sugerido que la actividad bacteriana puede ser mantenida aun bajo condiciones de baja temperatura. En efecto, se ha descrito la presencia de microorganismos adaptados al frío en lagos antárticos, núcleos de hielo, nieve y glaciares (Bakermans *et al.*, 2003; Prince *et al.*, 2004; Wettlaufer, 1999). Las estrategias utilizadas para sobrevivir a disminuciones de temperatura, son comunes entre los grupos mesófilos, psicrófilos y halófilos (Mykytczuk *et al.*, 2013), dentro de ellas se describe: reducción del tamaño celular; reducción de la capa de polisacárido capsular; modificación de su composición de ácidos grasos de membrana (Price y Sowers, 2004).

Como se indicó, las bacteria poseen sistemas de detección frente a cambios en la temperatura del medio, los cuales generan una respuesta frente a una posible alteración del ambiente que afecte los procesos metabólicos o que impliquen un potencial daño celular (Rubiano-Labrador *et al.*, 2015). Sin embargo, las vías de detección difieren en cuanto a su velocidad de respuesta y señalización. Así, cuando ocurre una disminución de la temperatura se producen alteraciones locales en la topología del DNA, lo que genera cambios en la expresión de genes específicos. De ese mismo modo, temperaturas bajas modifican la estructura de los ARNm y ARNt, alterando de manera directa la traducción de RNAm ya existentes o nacientes (Anderson *et al.*, 2006). Para contrarrestar estos efectos la bacteria debe frecuentemente aclimatarse a estas condiciones, lo cual requiere la producción de proteínas de shock frío que por una parte contrarrestan la pérdida de fluidez de la membrana, y por otra la formación de estructuras de ARN estables para que no

interfieran con la iniciación de la traducción y elongación (Breaker, 2010). En efecto, en *Escherichia coli* se ha descrito la inducción en la expresión de la proteína de choque frío A (CspA) como uno de los primeros eventos luego de la exposición celular a un estrés de frío. Esta proteína es una chaperona de RNAs que previene la formación de estructuras secundarias a bajas temperaturas (Mykytczuk *et al.*, 2013).

Se han descrito otras estrategias de sobrevivencia en bacterias aisladas de hielos árticos, las cuales pueden permanecer viables mediante el mantenimiento de niveles mínimos de actividad (Bakermans *et al.*, 2003). Wettlaufer (1999); Price y Sowers (2004), demostraron la existencia de poblaciones bacterianas en venas líquidas obtenidas desde muestras de hielo Ártico. Estudios realizados por Junge *et al.* (2004) en muestras de hielo desde el mar Ártico, indicaron que las células procariontes activas detectadas eran de 0,5 a 4%. Esta proporción fue similar a la encontrada en muestras de agua de mar en verano. Esto sugiere que estas bacterias poseen adaptaciones específicas que le permiten sobrevivir a grandes oscilaciones de temperatura ambiental, como son las encontradas en periodos invierno-verano en el Ártico. Por su parte Martínez *et al.* (2009) informó un 0,1% de bacterias recuperables desde núcleos de hielo obtenidos desde la meseta de la Infantería en el territorio Antártico chileno. Estos antecedentes, en su conjunto permiten suponer que la fracción remanente no recuperable detectada por Martínez (2009) o Junge (2004) podría estar compuesta de células bacterianas que han disminuido su actividad metabólica. En base a lo anterior, el porcentaje máximo de células activas descrito por Junge *et al.* (2004) alcanzó el 4%. Sin embargo, queda una fracción de la población que no presentó actividad metabólica, y que bien podría tratarse de células que disminuyeron su actividad a niveles no detectados entrando en un estado metabólico conocido como dormancia. Así mismo, Guerra *et al.* (2013) describió que en condiciones de inanición de carbono y temperaturas de 4°C se observó un aumento en el porcentaje de células en estado de dormancia metabólica. Esto sugiere que en respuesta a condiciones de baja temperatura las bacterias disminuyen su actividad metabólica.

De manera similar, Price y Sowers (2004) describen la presencia de tres grupos de comunidades bacterianas según su tasa metabólica. El primer grupo posee una tasa metabólica alta, en donde las bacterias se encuentran en crecimiento constante (0,1 g de carbono incorporado dentro de células por gramo de biomasa de carbono por hora) el segundo grupo presenta una tasa metabólica inferior al anterior (10^{-5} g de carbono incorporado dentro de células por gramo de biomasa de carbono por hora), solo suficiente para el mantenimiento de las funciones celulares, pero no para sustentar el crecimiento celular, la cual depende, en parte, de la concentración de nutrientes como de la temperatura. Finalmente un tercer grupo con una tasa metabólica mínima, 3 ordenes menor al anterior (10^{-8} g de carbono incorporado dentro de células por gramo de biomasa de carbono por hora), en donde se encuentran comunidades de sedimentos oceánicos o hielo glacial, las que se encuentran probablemente en dormancia esperando condiciones ambientales favorables (Morita, 1997).

El permafrost representa el 26% de los ecosistemas del suelo terrestre, y es considerado un entorno con baja disponibilidad de agua, ya que las temperaturas cercanas a 4°C en la célula bacteriana tienden a la disminución del agua líquida disponible. Se ha descrito que las bacterias aisladas desde permafrost son en su mayoría psicotolerantes, y al mismo tiempo tienden a ser halotolerantes (Ponder *et al.*, 2005; Steven *et al.*, 2006). Lo que sugiere una posible relación entre halotolerancia y psicotolerancia (Mykytczuk *et al.*, 2013; Steven *et al.*, 2006). En efecto, la formación de hielo aumenta la concentración de solutos al disminuir la cantidad de agua libre disponible. Esto produce un ambiente intracitoplasmático con baja actividad de agua, similar a los que ocasionan los ambientes salinos con alta osmolaridad (Ponder *et al.*, 2008). Rand *et al.* (2004) determinó que la actividad de agua en el permafrost corresponde a una concentración 5 Osm (osmolar) de NaCl. Como respuesta a la baja actividad de agua, ocasionado por un ambiente con elevada osmolaridad o bien temperaturas cercanas a 4°C, la bacteria requiere recuperar su presión de turgencia y su actividad de agua para mantener la

respiración celular y proporcionar la energía requerida para los procesos celulares (Ponder *et al.*, 2005), activando mecanismos de respuesta que le permitan sobrevivir a estos estrés.

Por otro lado, una variación en la concentración de solutos y metabolitos internos en un nivel superior a 250 mOsm, es considerado como estrés hiperosmótico (Deaton, 2001). Se ha descrito que varios grupos bacterianos en condiciones de estrés osmótico, disminuyen su actividad metabólica (Darcan *et al.*, 2008). Ponder *et al.* (2005) indicó que en *Psychrobacter arcticus*, el aumento de la osmolaridad disminuyó la tasa de crecimiento, al ser cultivada en presencia de NaCl a 24°C y que bajo las mismas condiciones osmolares, pero cultivadas a 4°C, las bacterias mantuvieron constante su tasa de crecimiento. En base a esto, los autores sugieren que la disminución de temperatura ejercería un efecto protector sobre la actividad metabólica bacteriana, en presencia de estrés hiperosmótico en el medio. Estudios posteriores de Ponder *et al.* (2008), indicaron que el porcentaje de células activas disminuía al 50%, cuando *P. arcticus* era cultivada por 14 días a 4 °C y 5 Osm de NaCl o sacarosa. Sin embargo, los procesos metabólicos como; el transporte de electrones, respiración aerobia y la síntesis de proteínas continuaban activos en el porcentaje remanente de células activas. Estos antecedentes indican que existe una población metabólicamente activa, pese a la ausencia de crecimiento celular. Por otro lado, para mantener el transporte de electrones y la viabilidad celular, las bacterias deben mantener la presión de turgencia (Yao *et al.*, 2002). Las bacterias Gram positivas poseen paredes celulares más gruesas lo que les permite soportar mayores incrementos de la presión de turgencia que las células Gram negativas (Ponder *et al.*, 2005). Adicionalmente, los autores observaron la presencia de cápsulas de polisacárido rodeando a *P. arcticus* cuando estas eran cultivadas en 5 Osm de NaCl, sin embargo la cápsula estaba ausente en ausencia del estrés osmótico. Los autores propusieron que la presencia de esta cápsula puede permitir la adhesión a las partículas del suelo y, por lo tanto, el acceso a las capas de agua no congeladas para así mantener su actividad metabólica y mejorar la sobrevivencia.

(Ponder *et al.*, 2008).

La hidrólisis de ATP en ADP es la fuente principal de energía para la mayoría de las reacciones metabólicas endergónicas en la célula (Berg *et al.*, 2009). Debido a su papel en la transferencia de energía bioquímica, la concentración de estas moléculas proporciona información acerca del estado metabólico bacteriano (Amato y Christner, 2009). Napolitano y Shain (2005) describieron que microorganismos psicrófilos aumentan su concentración de ATP celular (entre 20 - 50%) a temperaturas decrecientes a pesar de tener tasas de crecimiento más lentas. Esto se explica con el propósito de mantener elevados niveles de ATP y así compensar la pérdida en el movimiento molecular que se produce a menores temperaturas. Amato y Christner (2009) estudiaron el efecto de la disminución de temperatura sobre las moléculas de ATP y ADP. Describieron en *Psychrobacter cryohalolentis* K5, durante los primeros 190 min., una duplicación de las concentraciones de ATP y ADP a medida que disminuía la temperatura (desde 22°C a -80°C). De igual manera, cuando las células fueron expuestas a shock osmótico (1M NaCl) las concentraciones de ATP y ADP aumentaron durante los primeros 140 min de exposición. Los autores propusieron que el aumento de ambas moléculas podría ser a una respuesta fisiológica para compensar la disminución de difusión de las mismas, frente a una baja actividad de agua, permitiendo de esta manera que las células mantengan los procesos bioquímicos, y por tanto su actividad metabólica (Amato y Christner, 2009).

Por otro lado, Mykytczuk *et al.*, (2013) describieron que a -15°C *Planococcus halocryophilus* experimentaba represión de las enzimas involucradas en el metabolismo energético. Sin embargo, las enzimas involucradas en la actividad de la cadena transportadora de electrones, como la ATPsintasa, aumentaron su expresión. Adicionalmente, se detectó incrementos en enzimas inducidas por alta osmolaridad, así como también de oxidoreductasas y deshidrogenasas (Pumirat *et al.*, 2009). Otras regulaciones a nivel proteico, incluyen la acción de chaperonas moleculares, que ayudan en el plegamiento de proteínas y proteasas dependientes de ATP

(Rubiano-Labrador *et al.*, 2015). Por otro lado, *Burkholderia pseudomallei* expresa enzimas, reguladores de transcripción y traducción, posibles factores de virulencia, chaperonas y reguladores de transporte de solutos en condiciones de altos niveles de salinidad (Pumirat *et al.*, 2009). En *Tistlia consotensis* cultivada en condiciones de alta salinidad (4,0% de NaCl) se detectaron cambios en la expresión de proteínas implicadas en la transducción de señales, como “methyl-accepting chemotaxis proteins” (MCPs) y proteínas quinasas CheA, las cuales son los dos principales mecanismos por los cuales los microorganismos censan señales ambientales y responden quimiotácticamente frente al estímulo (Rubiano-Labrador *et al.*, 2015). Estos antecedentes indicarían que la respuesta frente a estrés osmótico será similar a la respuesta generada por la exposición a bajas temperaturas, más aun la exposición a temperaturas de congelamiento del agua induce la expresión de proteínas relacionadas con respuesta a alta osmolaridad (Bakermans *et al.*, 2012).

Además de las alteraciones a nivel proteico y energético, se han detectado modificaciones a nivel de membrana (Mykytczuk *et al.*, 2013). En *E. coli* se describió una disminución de la fluidez de la membrana al incrementar la presión osmótica, (Vaknin y Berg 2006). Además, de esta bacteria, la membrana celular de otros organismos incluidos *Zygosaccharomyces rouxii*, *Shewanella gelidimarina*, *Bacillus subtilis*, y *Lactobacillus bulgaricus* han mostrado volverse mas rígidas en ambientes salinos o con elevada osmolaridad (Bergmann *et al.*, 2013). El aumento en la rigidez de la membrana implica variaciones de pH y de la fuerza iónica del citoplasma, las que influyen en el largo de los fosfolípidos y las cargas superficiales de la membrana. Esto conlleva a cambios en la configuración estérica de los fosfolípidos, y por tanto, en la fluidez de membrana. Sin embargo, esta estrategia genera alteraciones en el transporte de moléculas a través de canales mecanosensitivos, cambios en la hidratación de la bicapa de fosfolípidos y contracción del volumen celular (Bergmann *et al.*, 2013). Debido a esto es que la célula bacteriana utiliza otras estrategias de protección frente a estos estrés, que le permitan sobrevivir mitigando las consecuencias negativas para su metabolismo que se generan por la disminución de

la actividad de agua producto de la disminución de la temperatura o incremento de osmolaridad. Es por esto, que a bajas temperaturas, como en alta osmolaridad, mejora la absorción de moléculas osmoprotectoras, llamadas solutos compatibles, que participan en la mantención de la presión osmótica y mantienen la presión de turgencia celular (Wood, 1999). Estas moléculas le permiten a la célula bacteriana mantener sus procesos bioquímicos y metabólicos en ambas condiciones.

1.2 Osmoprotectores

La disminución de la actividad de agua, producto de la disminución de la temperatura o incremento de osmolaridad, alteran la presión osmótica de las bacterias. Modificando las interacciones proteína-ácido nucleico, plegamiento de proteínas o propiedades del medio intracelular, además de inhibición de los procesos energéticos en la membrana (Iscla y Blount, 2012), afectando el normal funcionamiento y composición del citoplasma y membrana citoplasmática. En respuesta a estas perturbaciones intracelulares, las bacterias acumulan compuestos denominados solutos compatibles. Dentro de las características que poseen es ser moléculas orgánicas, de bajo peso molecular, que tengan una alta solubilidad en el citoplasma y sin carga neta (Imhoff, 1986). Estos compuestos pueden ser, polioles, poliaminas, azúcares y derivados de aminoácidos. (Shivaji y Prakash, 2010). Éstos funcionan como "chaperonas químicas", evitando así la desnaturalización y agregación de macromoléculas (Shivaji y Prakash, 2010). La trehalosa, GB y carnitina son algunos de los solutos compatibles que se acumulan luego de un shock de frío en bacterias, llamándose también crioprotectores. Los solutos compatibles, son compuestos que se acumulan en el citoplasma, incluso a concentraciones intracelulares altas, y poseen la propiedad de ser compatibles con la función celular, de tal manera que no interfieren con el metabolismo de la célula (Kandror *et al.*, 2002).

Los osmoreguladores, permiten el mantenimiento de las funciones celulares y metabolismo a la célula bacteriana cuando estas se encuentran en condiciones de baja actividad de agua (Chen y Beattie, 2008). Esto debido a que mantienen la presión osmótica intracelular mayor a la del medio externo, con el fin de mantener la turgencia celular. Esta última, es considerada fundamental para el crecimiento celular, la división y el metabolismo (Yao *et al.*, 2002). Además, se ha descrito que la actividad de agua en el citoplasma es 1.5 veces mayor en presencia de solutos compatibles (Chen y Beattie, 2008).

La primera respuesta celular frente al aumento de osmolaridad del medio, es la acumulación de ion potasio (K⁺) y aniones orgánicos, como glutamato (Welshm, 2000). A medida que aumenta la osmolaridad externa se incrementa de manera proporcional la captación y concentración intracelular de osmoprotectores (Wood, 2011). De esta manera los solutos compatibles como GB o prolina pueden sustituir a (K⁺), glutamato o trehalosa, convirtiéndose en los solutos predominantes en el citoplasma en estas condiciones (Welshm, 2000).

La acumulación intracitoplasmática de solutos compatibles puede ser por síntesis *de novo* o por medio de la absorción desde el ambiente (Sleator y Hill, 2002). Estos compuestos pueden funcionar directamente como solutos compatibles, como GB, o como precursores, como ocurre con colina que es precursora de GB. Sin embargo, la obtención de los solutos compatibles desde el medio es favorecida, ya que es energéticamente menos costosa (Chen y Beattie, 2008). Puesto que para la síntesis *de novo* es necesario que la bacteria previamente exprese la información genética para la síntesis de enzimas específicas para esta conversión (Sleator y Hill, 2002).

En *E. coli*, el aumento de la trehalosa citoplasmática es consecuencia de la regulación positiva del operón *otsAB*, el cual genera trehalosa a partir de glucosa, cuando las bacterias son traspasadas de una temperatura de 37°C a 16°C. (Kandror

et al., 2002). Por el contrario, estudios realizados por Skjerdal (1996) en una bacteria Gram positiva cultivadas en medios hiperosmóticos con sacarosa, indicaron que osmoprotectores obtenidos desde el medio extracelular, como GB poseían un mayor efecto protector que aquellos sintetizados, como prolina o ácido glutámico (Skjerdal *et al.*, 1996). En *P. cryohalolentis* no se han identificado los mecanismos específicos que mantienen la turgencia celular bajo estrés osmótico, sin embargo su genoma incluye genes para transportadores de osmoprotectores mecanosensibles. (Amato y Christner 2009). Esto sugiere, que la utilización de osmoprotectores como estrategia para contrarrestar los efectos negativos de las variaciones de temperatura u osmolaridad, sería utilizada por las bacterias, permitiéndole aumentar el rango de temperatura de crecimiento y manteniendo su actividad metabólica en condiciones adversas.

En los sistemas acuáticos se ha descrito que una fracción de la población bacteriana tiene actividad metabólica disminuida, o en dormancia metabólica, la cual constituye un reservorio celular a modo de “semillas” hasta que las condiciones del medio sean favorables (Darcan *et al.*, 2008; Lennon y Jones, 2011). Sin embargo, aun es desconocido si la protección sobre la actividad metabólica proporcionada por los osmoprotectores, es suficiente para mantener los niveles metabólicos necesarios para evitar que las células bacterianas entren en un estado de dormancia metabólica cuando son expuestas a aumento de osmolaridad o disminución de temperatura.

1.3 Dormancia

La dormancia, es la capacidad de un organismo para entrar en un estado de baja actividad metabólica, cuando las condiciones ambientales son desfavorables. Este estado es una condición metabólica reversible, puesto que son capaces de recuperar su actividad metabólica, cuando ocurre un cambio favorable en su ambiente (Lennon y Jones, 2011). Si bien esta condición tiene ventaja para la

sobrevivencia de la población, la dormancia no es una estrategia sin costo. En efecto, organismos deben invertir recursos en estructuras y maquinaria necesaria para hacer la transición de una condición activa a otra inactiva (Dworkin y Shah, 2010). Además, las bacterias dormantes deben tener la capacidad para detectar y responder a las señales asociadas a condiciones favorables, puesto que de lo contrario podrían perder oportunidades de crecimiento y reproducción (Keep *et al.*, 2006). Se ha descrito que bacterias aisladas desde glaciales o sedimentos antárticos se encuentran con su actividad metabólica disminuida. Sin embargo, al ser cultivadas en medios nutritivos recuperan su actividad, por lo que podrían encontrarse en un estado de dormancia (Price y Sowers, 2004). Al suplementar osmoprotectores al medio, estos le proporcionan mayor resistencia a estas condiciones adversas, por lo cual mantendrían su actividad metabólica, disminuyendo la proporción de células que ingresen a dormancia.



2. HIPÓTESIS

La disminución de la actividad metabólica es una estrategia de supervivencia frente a ambientes desfavorables. Esta disminución del metabolismo se acentúa en medios con osmolaridad elevada y bajas temperaturas. En estas condiciones la célula requiere de solutos compatibles, para mantener la homeostasis celular y evitar daño en sus macromoléculas. Basados en estos antecedentes,

“Se postula que las bacterias de ambientes fríos utilizan GB, molécula con propiedades osmoprotectoras, para evitar que los incrementos de la osmolaridad o descensos de temperatura disminuyan su actividad metabólica”.



3. OBJETIVOS.

3.1 Objetivo General

Determinar si la disponibilidad de osmoprotectores evita que las bacterias de ambientes acuáticos patagónicos o antárticos disminuyan su actividad metabólica al ser expuestas a aumento de osmolaridad o disminución de la temperatura.

3.2 Objetivos Específicos

1. Determinar si la osmolaridad y la temperatura modifican la actividad metabólica de bacterias aisladas de ambientes fríos.
2. Determinar si en condiciones de osmolaridad creciente y temperaturas cercanas al congelamiento del agua, la disponibilidad de osmoprotectores como GB le permiten conservar la actividad metabólica de las bacterias aisladas de ambientes fríos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 Cepas bacterianas

Se utilizó la cepa bacteriana *Deinococcus sp.* (UDEEC-P1) (Fernández-Bunster *et al.*, 2011), aislada del Lago Témpanos en la Patagonia Chilena y *Psychrobacter sp.* (UDEEC-A5), aislada desde un núcleo de hielo de la Antártica Chilena. Ambas pertenecientes al Laboratorio de Microbiología Básica y Biorremediación del Departamento de Microbiología de la Universidad de Concepción.

4.2 Medio de cultivo

Se utilizó medio salino mineral (MSM) con la siguiente composición: Na_2HPO_4 0.570 g/L, KH_2PO_4 0.365 g/L, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, $(\text{NH})_2\text{SO}_4$ 0.5 g/L (Aranda *et al.*, 2003), se suplementó con piruvato de sodio 0.3g/L (Beumer *et al.*, 1994) y elementos traza (2,5ml/l). La solución de elementos traza contenía: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ 880 mg/L, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 200 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/L, H_3BO_3 10 mg/L, $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/L, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/L, $\text{MnSO}_4 \times 1\text{H}_2\text{O}$ 4 mg/L, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 4 mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 3 mg/L, $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 2 mg/L y H_2SO_4 0.05 N. El MSM suplementado con los compuestos anteriores fue denominado como MSM+TP.

Las cepas bacterianas, *Deinococcus sp.* (UDEEC-P1) y *Psychrobacter sp.* (UDEEC-A5), fueron cultivadas en caldo R2A (DIFCO Laboratories, Detroit, USA) por 48 h a 30°C y 20°C, respectivamente. Luego alicuotas de 1 ml de cada cepa bacteriana fueron centrifugadas a 14000rpm durante 2 min y el pellet suspendido en 1 ml de MSM y posteriormente cultivado en MSM+TP a una densidad celular final de 1.0×10^5 UFC/ml.

4.3 Caracterización de las cinéticas de crecimiento de las cepas bacterianas.

Con el propósito de determinar la temperatura con mayor velocidad de crecimiento para cada cepa, estas fueron cultivadas en MSM+TP. Para esto, previamente fueron cultivadas en caldo R2A durante 48h en agitación constante a 120rpm, luego 1 ml del cultivo fue centrifugado a 14000rpm durante 2 min y el pellet celular suspendido en 1 ml de MSM. Proceso realizado 3 veces. Con la suspensión bacteriana se procedió a inocular en matraces conteniendo 100ml de MSM+TP. Ambas cepas fueron incubados en agitación constante a 120 rpm a 10°C, 20°C, 30°C ó 37°C, y se obtuvieron alicuotas cada 12h para determinar el recuento bacteriano viable (RVB) por el método de la microgota hasta completar 140h (Herbert *et al.*, 1990). Esta experiencia se realizó por triplicado para cada temperatura por cada cepa.

4.4 Determinación de temperatura de estrés por frío.

Se utilizó el criterio de Hébraud y Potier (1999) para la determinación de la temperatura de estrés por frío. Definido como una temperatura 10°C inferior a la temperatura a la cual alcanza la mayor velocidad de crecimiento, en base al punto 4.3.

4.5 Concentración de NaCl inhibitoria del crecimiento.

Para determinar el efecto osmolar sobre el crecimiento bacteriano, se ensayó el crecimiento en MSM+TP con concentraciones de NaCl de 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 ó 1.0 M (Beumer *et al.*, 1994) y se determinó su efecto sobre el crecimiento mediante turbidez luego de 120h de cultivo. Esta experiencia se realizó por quintuplicado para cada concentración por cada cepa.

4.6 Caracterización de las cinéticas de crecimiento de las cepas bacterianas en concentración de NaCl.

Con el propósito de determinar la cinética de crecimiento en concentraciones de NaCl, cada cepa bacteriana fue cultivada en MSM+TP+NaCl. Previamente, cultivadas en caldo R2A durante 48h en agitación a 120rpm, luego 1 ml del cultivo fue centrifugado a 14000rpm durante 2 min y el pellet celular suspendido en 1 ml de MSM. Proceso realizado 3 veces para la eliminación de residuos provenientes desde el medio R2A. Con la suspensión bacteriana se procedió a inocular en matrices conteniendo 100ml de MSM+TP. Para *Psychrobacter* sp. (UDECA-A5) el MSM+TP fue suplementado con 0.25, 0.5 ó 1M de NaCl y cultivado a 20°C. Para *Deinococcus* sp. (UDECA-P1) el MSM+TP fue suplementado con 0.05, 0.1 ó 0.25M de NaCl y cultivado a 30°C. Estas condiciones fueron seleccionadas debido a los resultados obtenidos en los puntos 3.4 y 3.5. Los matraces de ambas cepas fueron incubados en agitación constante a 120rpm durante 140h, y se obtuvieron alicuotas cada 12h para determinar el recuento bacteriano viable (RVB) por el método de la microgota (Herbert *et al.*, 1990). Esta experiencia se realizó por triplicado para cada concentración de NaCl estudiada por cada cepa.

4.7 Evaluación de la actividad metabólica.

Para determinar la actividad metabólica se utilizó microplacas de 96 pocillos (Tissue culture plate, 96 well Ultra Cruz) según el protocolo descrito por Johsen *et al.*, (2002), para la determinación de la actividad metabólica. Se utilizó la sal de tetrazolium WST-1, el cual es indicador del estado metabólico de la célula. Con las siguientes modificaciones: Se adicionó una solución de piruvato (40 mM) en buffer

Tris (40 mM) (pH 6,5), la que actuó como solución dadora de electrones (SDe) para permitir un aumento del potencial de reducción del cultivo.

Se agregó a cada pocillo de la microplaca 50 μ L de SDe, se incubó por 90 minutos a la temperatura utilizada para cada tratamiento. Luego se adicionaron 10 μ L del reactivo WST-1. La absorbancia se midió a 450 nm, inmediatamente después de inocular WST-1 y luego de 90 minutos de incubación a la misma temperatura utilizada para cada tratamiento. La absorbancia se midió en un Espectrofotómetro para Microplacas Epoch de Biotek instruments. Esta experiencia se realizó por triplicado para cada condición de estudio seleccionada, para cada cepa. Cada replica fue incubada en 5 pocillos de la microplaca. Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos por espectroscopía se utilizó el software IBM SPSS Statistics 21 y el programa GraphPad Prism 6.0.

4.8 Evaluación del efecto osmoprotector de GB sobre la actividad metabólica.

Se midió la actividad metabólica de *Deinococcus* sp. UDEC-P1 a 30°C y 20°C en MSM+TP suplementado con 0.1M de NaCl ó 0.25M de NaCl. Con *Psychrobacter* sp. UDEC-A5 a 20°C y 10°C se utilizó MSM+TP suplementado con 0.5M ó 1.0M de NaCl. La determinación de la actividad metabólica se realizó al inicio de la fase estacionaria de los cultivos, en base a la información obtenida anteriormente en el punto 4.3 y 4.6.

Se realizó otra determinación de la medición de la actividad metabólica con las mismas condiciones para cada cepa, pero estas muestras fueron suplementadas al inicio del experimento con GB 5,0 mM (Beumer *et al.*, 1994). La medición de la actividad metabólica se realizó con sales de tetrazolium WST-1, para ambos experimentos se realizó como se describió en el punto 4.7.

4.8.1 Medición de la actividad metabólica frente a distintas concentraciones de

GB.

Se midió la actividad metabólica de *Deinococcus* sp. UDEC-P1 a 30°C en MSM+TP suplementado con 0.1M de NaCl y 0.05mM ó 0.1mM de GB. También se cultivó en MSM+TP con 0.25M NaCl, pero suplementado con GB 15mM ó 10mM. Para *Psychrobacter* sp. UDEC-A5 se incubó a 20°C y se utilizó MSM+TP suplementado con 0.5M de NaCl y concentraciones de GB de 0.05mM ó 0.1mM, y adicionalmente se cultivó en MSM+TP con 0.1M NaCl suplementado con 15 ó 10mM de GB.

4.8.2 Efecto de NaCl sobre concentración celular bacteriana.

Se cultivaron ambas cepas durante 70h correspondiente al inicio de fase estacionaria, en presencia o ausencia de 5mM GB, luego de este tiempo se agregó NaCl a una concentración final de 0.5M para *Psychrobacter* sp. UDEC-A5 y 0.1M para *Deinococcus* sp. UDEC-P1, y se determinó la actividad metabólica utilizando sal de tetrazolium WST-1, luego de 120h de cultivo como fue descrito en el punto 4.7

4.9 Calibración de parámetros para citometría de flujo.

Se utilizó el equipo de citometría de flujo FACSAriaIII (BD, Biosciences), perteneciente al Centro de Microscopía Avanzada (CMA, Concepción, Chile), el cual posee un inyector o nozzle de 70µm. Se calibraron los parámetros de citometría de flujo, cultivando las cepas *Psychrobacter* sp. UDEC-A5 y *Deinococcus* sp. UDEC-P1 en MSM+TP, luego de 70h de cultivo a 20°C ó 30°C, respectivamente. Alicuotas de 0,5ml de cada cultivo fueron centrifugaron a 5000g por 3 min. El sobrenadante fue removido y el pellet celular fue suspendido en 0,5ml de Buffer fosfato estéril (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Biological industries). Estos pasos de lavado

se repitieron tres veces. El umbral de detección (Threshold) que delimita la adquisición de datos se configuró para el parámetro Forward Scatter FSC, de acuerdo con los tamaños que presentan ambas cepas bacterianas. El análisis de los datos obtenidos por citometría de flujo fue realizado utilizando el software FlowJo Versión 10.1. (Oregon, USA). Para el análisis estadístico se utilizó el software IBM SPSS Statistics 21.

4.9.1 Calibración de parámetros del citómetro de flujo utilizando esferas de Policarbonato.

Para establecer una referencia del tamaño de las células y su ubicación en los gráficos Forward Scatter (FSC) versus Side Scatter (SSC). Se utilizaron esferas de policarbonato de 6µm de diámetro (Beads), provenientes del kit comercial LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability and Counting Kit. Estas esferas se encuentran a una concentración de 10⁸ esferas/ml, por lo cual se utilizó un volumen de 10µl y se adicionaron a 990µl de Buffer fosfato. Posteriormente se realizó la adquisición de 20000 eventos por muestra. Los datos fueron analizados en función de Forward Scatter (FSC) y Side Scatter (SSC).

4.9.2 Evaluación de la actividad metabólica mediante citometría de flujo.

Se evaluó la actividad metabólica de las células bacterianas luego de 120h de cultivos, realizando tres replicas para cada tratamiento. En *Deinococcus* sp. UDEC-P1 se evaluó a 30°C ó 20°C en MSM+TP, o suplementado con 0.1M de NaCl y *Psychrobacter* sp. UDEC-A5 a 20°C ó 10°C se utilizó MSM+TP o suplementado con 0.5M NaCl. Luego en ambas cepas, y con las mismas condiciones pero adicionando 5mM de GB. Posterior a los tratamientos, se centrifugó 1ml del medio conteniendo MSM+TP, MSM+TP+GB y MSM+TP+GB+NaCl. Se descartó el sobrenadante, y el

pellet celular fue suspendido en 1ml de Buffer fosfato estéril. Las muestras del tratamiento MSM+TP+NaCl fueron concentradas (x100) filtradas en filtros de policarbonato de 0.2µm y suspendido en 0.5ml de Buffer fosfato estéril.

Se utilizó el agente RedoxSensor Green (RSG) del Kit *BacLight RedoxSensor™ Green Vitality* (Invitrogen, USA). El cual es un indicador de la actividad reductasa, que es a su vez, un marcador para los cambios en la función de la cadena de transporte de electrones y por tanto indicatoría de los cambios en la actividad metabólica que se producen después del tratamiento. Se realizó la adquisición de 20000 eventos por muestra. Los datos utilizados correspondieron a la intensidad de emisión de fluorescencia verde obtenida en el receptor FitC.

4.9.3 Evaluación del tamaño celular relativo mediante citometría de flujo.

Se evaluó la actividad metabólica de las células bacterianas luego de 120h de cultivos, realizando tres replicas para cada tratamiento. En *Deinococcus* sp. UDEC-P1 se evaluó a 30°C ó 20°C en MSM+TP, o suplementado con 0.1M de NaCl y *Psychrobacter* sp. UDEC-A5 a 20°C ó 10°C se utilizó MSM+TP o suplementado con 0.5M NaCl. Luego en ambas cepas, y con las mismas condiciones pero adicionando 5mM de GB. Posterior a los tratamientos, se centrifugó 1ml del medio conteniendo MSM+TP, MSM+TP+GB y MSM+TP+GB+NaCl. Se descartó el sobrenadante, y el pellet celular fue suspendido en 1ml de Buffer fosfato estéril. Las muestras del tratamiento MSM+TP+NaCl fueron concentradas (x100) filtradas en filtros de policarbonato de 0.2µm y suspendido en 0.5ml de Buffer fosfato estéril. Se realizó la adquisición de 20000 eventos por cada réplica. La media geométrica del parámetro Forward Scatter (FSC) fue calculada en tres réplicas independientes por cada condición.

4.9.4 Evaluación de la complejidad citoplasmática relativa mediante citometría

de flujo.

Se evaluó la complejidad intracelular citoplasmática relativa de ambas cepas bacterianas en las condiciones descritas en el punto 3.9.3. Posterior a los tratamientos, se centrifugó 1ml del medio conteniendo MSM+TP, MSM+TP+GB y MSM+TP+GB+NaCl. Se descartó el sobrenadante, y el pellet celular fue suspendido en 1ml de Buffer fosfato estéril. Las muestras del tratamiento MSM+TP+NaCl fueron concentradas (x100) filtradas en filtros de policarbonato de 0.2µm y suspendido en 0.5ml de Buffer fosfato estéril. Se realizó la adquisición de 20000 eventos por cada réplica. La media geométrica del parámetro Side Scatter (SSC) fue calculada en tres réplicas independientes por cada condición.

4.10 Compensación automática

En ambas cepas en estudio, se determinó la compensación entre las tinciones del kit LIVE/DEAD BacLight RedoxSensor™ Green Viability (Molecular Probes, OR, USA). Por citometría de flujo, se realizó la adquisición de 5.000 eventos celulares desde suspensiones bacterianas teñidas con RedoxSensor Green (RSG) o con Yoduro de Propidio (IP) el cual es un indicador de la integridad de membrana. La tinción se realizó según las especificaciones del fabricante. La compensación entre los espectros de fluorescencia se calculó automáticamente con el software BD FACSDiva Software Versión 6.1.3.

5. RESULTADOS

5.1 Cinéticas de crecimiento bacteriano.

Las cinéticas de crecimiento de las cepas *Deinococcus sp.* UDEC-P1 y *Psychrobacter sp.* UDEC-A5 en MSM+TP a 10°C, 20°C, 30°C ó 37°C, indicaron que las temperaturas de mayor velocidad de crecimiento fueron 30 °C y 20 °C, (Tabla 2 y 3) respectivamente. En base a esto se determinaron las temperaturas de estrés por frío como 10°C y 20°C, para *Psychrobacter sp.* UDEC-A5 y *Deinococcus sp.* UDEC-P1 (fig.1 y fig. 3, respectivamente). Adicionalmente, *Deinococcus sp.* UDEC-P1 cultivada a 37°C en MSM+TP, mostró muerte celular, lo mismo ocurre para *Psychrobacter sp.* a temperaturas superiores a 30°C, debido a que no se observó recuento viable en estas temperaturas, tampoco se observó recuperabilidad en cultivo, ya que no hubo crecimiento al ser traspasado un inóculo de éste a un medio nutritivo.

5.2 Concentraciones de NaCl inhibitorias del crecimiento.

Se determinó que la CMI para *Psychrobacter sp.* UDEC-A5 fue 0,5M NaCl y para *Deinococcus sp.* UDEC-P1 fue 0.1M de NaCl. Se realizó una curva de crecimiento utilizando la CMI y el doble de esta concentración, para determinar la cinética de crecimiento de ambas cepas frente al estrés osmolar (fig. 1 y fig. 3)

Tabla 1. Crecimiento de *Psychrobacter sp.* UDEC-A5 y *Deinococcus sp.* UDEC-P1 en MSM+TP suplementado con NaCl.

	Concentración de NaCl (M)					
	Control	0,05	0,1	0,25	0,5	1
<i>Psychrobacter sp.</i> UDEC-A5	+	+	+	+	-	-
<i>Deinococcus sp.</i> UDEC-P1	+	+	-	-	-	-

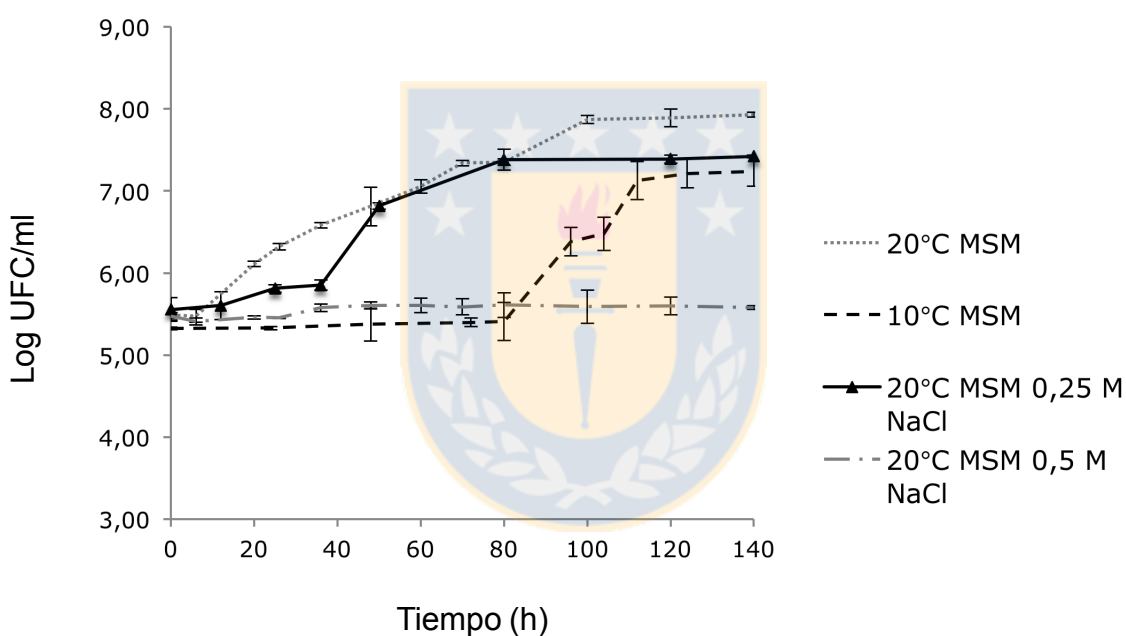


Figura 1. Cinética de crecimiento de *Psychrobacter sp.* UDEC-A5 en MSM+TP y NaCl.

Psychrobacter sp. UDEC-A5 alcanzó su fase estacionaria luego de aproximadamente 100h de cultivo en MSM+TP, a 20°C, logrando una densidad celular de 7.9 log UFC/ml. Al disminuir en 10 unidades la temperatura de crecimiento (10°C), se observó que la bacteria requiere 80h para aclimatarse al medio. Luego de este periodo comenzó su crecimiento, logrando un recuento final similar al control.

(7.2 log UFC/ml). En el tratamiento con 0.25M NaCl y temperatura de 20°C, *Psychrobacter sp.* fue capaz de crecer y multiplicarse (7.42 log UFC/ml), logrando un crecimiento similar al control. Sin embargo, al duplicar la concentración de NaCl (0.5M) no se observó crecimiento bacteriano, ni bacterias viables desde el inicio del experimento hasta las 140h de incubación.

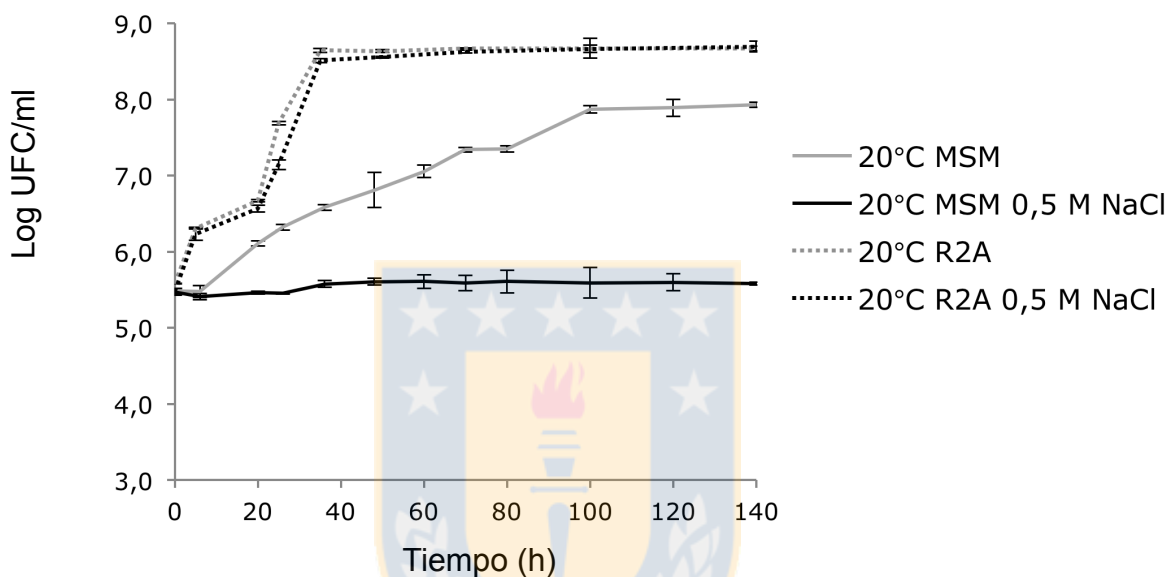


Figura 2. Cinéticas de crecimiento para *Psychrobacter sp.* UDEC-A5 en MSM+TP o R2A suplementado con NaCl.

Al comparar las curvas de 20°C en MSM+TP (7.93 log UFC/ml) y R2A (8.69 log UFC/ml), se detectó 1 log de diferencia en el recuento final con respecto al control en MSM+TP. En R2A, la bacteria alcanzó la fase estacionaria luego de aproximadamente 30h. Sin embargo, en MSM+TP tardó 100h para alcanzar la fase estacionaria. La cepa *Psychrobacter sp.* UDEC-A5 creció en MSM+TP suplementado con 0.25M de NaCl, no se observó crecimiento con 0.5M NaCl (Fig. 2), manteniendo el mismo recuento viable inicial. En R2A suplementado con 0.5M NaCl la bacteria alcanzó la fase estacionaria en 30h con una curva y recuento viable similar a R2A sin NaCl (8.69 log UFC/ml). Las cinéticas de crecimiento obtenidas en la cepa cultivada

en caldo R2A no presentaron diferencias significativas cuando fueron cultivadas en medio R2A suplementado con NaCl 1M.

Tabla 2. Velocidad de crecimiento de *Psychrobacter* sp. UDEC-A5.

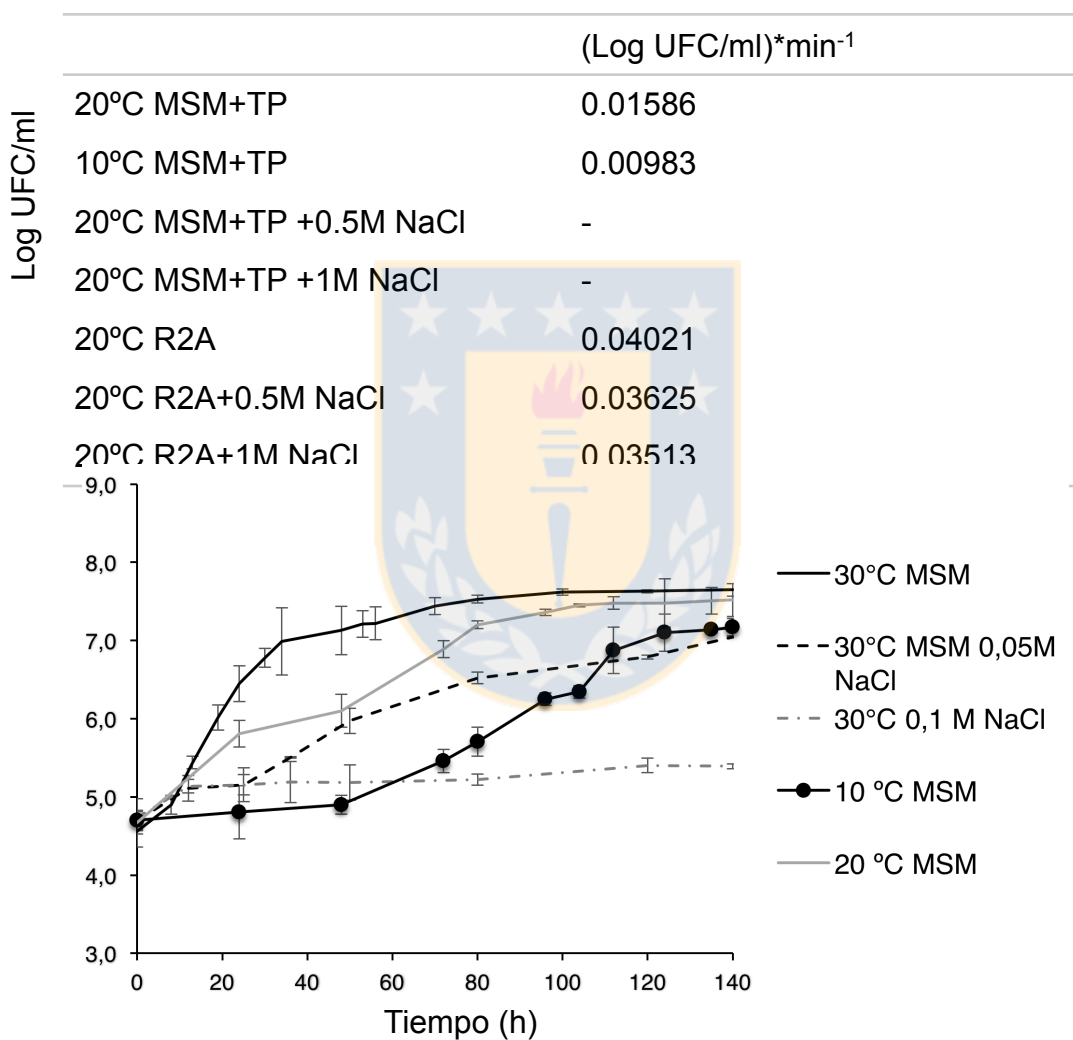


Figura 3. Cinética de crecimiento de *Deinococcus* sp. UDEC-P1 en MSM+TP y NaCl.

Los cultivos bacterianos en MSM+TP a 30°C alcanzaron su fase estacionaria luego de aproximadamente 80h de cultivo, obteniendo un recuento bacteriano final

de 7.82 log UFC/ml. Al disminuir en 10 unidades la temperatura de crecimiento (20°C), esta cepa demoró 110h en alcanzar la fase estacionaria, si bien existe una diferencia de 30h el recuento viable final a 20°C es similar al control (7.52 log UFC/ml). Los cultivos bacterianos expuestos a 20 unidades de temperatura menor que el control (10°C), permanecieron 48h en fase lag. Luego de este tiempo, comenzó su fase de crecimiento exponencial, sin embargo este crecimiento final fue 0.7 log menor al la temperatura control (7.1 log UFC/ml).

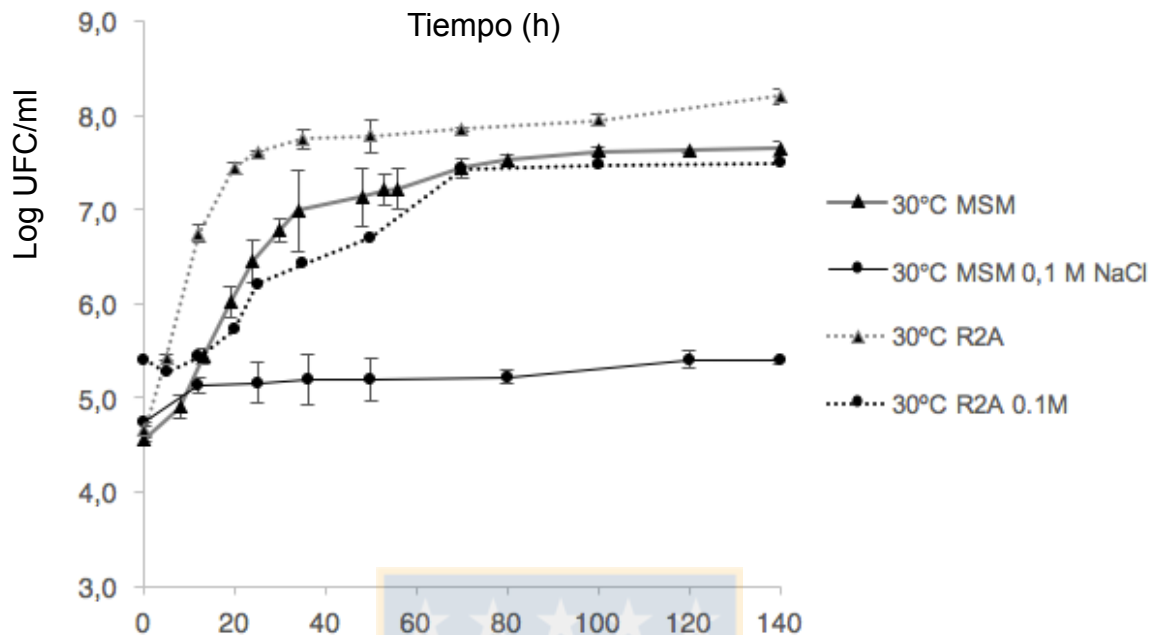
Tabla 3. Velocidades de crecimiento *Deinococcus* sp. UDEC-P1.

Por otro lado, *Deinococcus* sp. UDEC-P1 tolera una concentración de 0.05M

	(LogUFC/ml)*min ⁻¹
10°C MSM+TP	0.01012
20°C MSM+TP	0.01736
30°C MSM+TP	0.03961
30°C MSM+TP +0.1M NaCl	-
30°C MSM+TP +0.05M NaCl	0.00761
30°C R2A	0.04146
30°C R2A 0.25M	-
30°C R2A 0.1M	0.02283

NaCl en MSM+TP, alcanzando un recuento viable similar al obtenido en 10°C (7.04 log UFC/ml). Sin embargo, al aumentar la concentración de NaCl a 0.1M no se observó incremento en el recuento celular bacteriano, manteniendo el mismo recuento viable inicial hasta las 140h de incubación.

Figura 4. Cinética de crecimiento de *Deinococcus* sp. UDEC-P1 en MSM+TP o R2A suplementado con NaCl.



Las cinéticas de crecimiento de *Deinococcus* sp. UDEC-P1 en MSM+TP (7.49 log UFC/ml) y R2A (8.20 log UFC/ml) mostraron diferencias de 0.7 log en el recuento final con respecto al control en MSM+TP. En R2A, la bacteria alcanzó la fase estacionaria luego de aproximadamente 25h de incubación. Sin embargo, en MSM +TP se demoró 80h para alcanzar la fase estacionaria. Si bien, la bacteria crece en MSM +TP suplementado con 0.05M de NaCl (7.04 log UFC/ml), en medio R2A con 0.05M NaCl la bacteria alcanzó la fase estacionaria en menor tiempo, mostrando una curva similar al control en R2A (8.20 log UFC/ml). Pero, con una diferencia de 1.0 log entre MSM+TP y R2A a la misma concentración de NaCl (0.05M). Además, se observó una respuesta similar de *Deinococcus* sp. UDEC-P1 en medio R2A suplementado con 0.1M NaCl, en donde la bacteria alcanzó la fase estacionaria luego de 70h de incubación (7.44 log UFC/ml), mostrando un recuento bacteriano final similar a cuando se incubó en MSM+TP. Sin embargo, en MSM+TP suplementado con NaCl 0,1M la bacteria mantiene su recuento viable inicial hasta las 140h del experimento (5.40 UFC/ml).

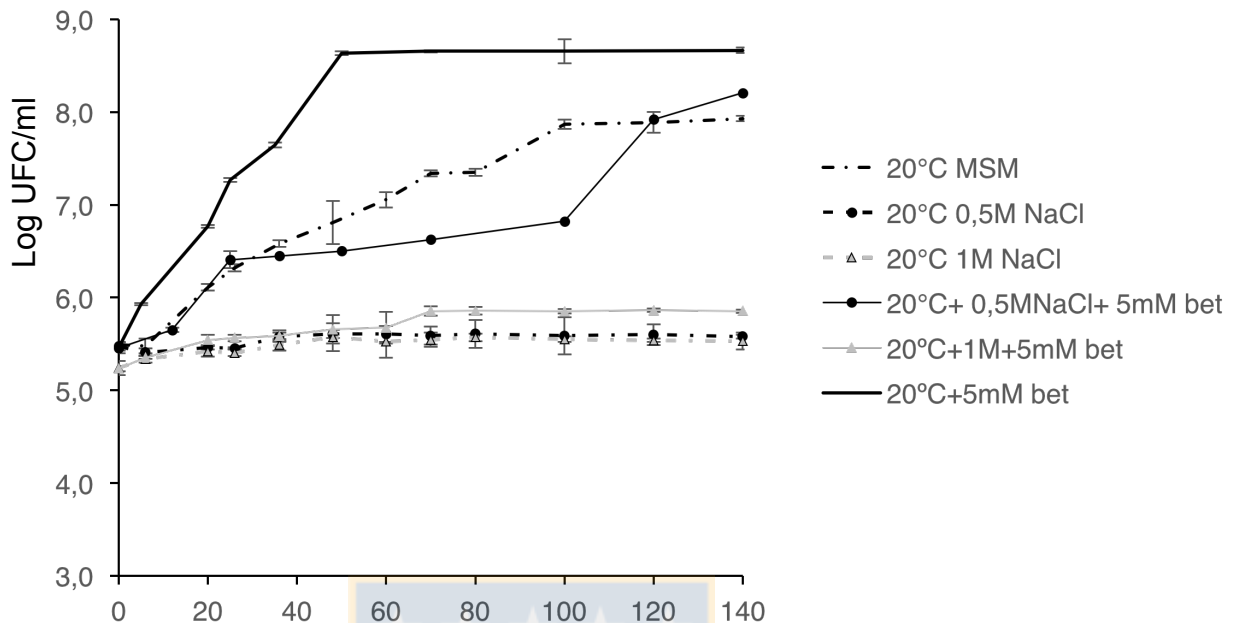
5.3 Cinética de crecimiento bacteriano en presencia de GB.

Concentraciones de 1mM ó 5mM de GB, permitieron el crecimiento bacteriano con el doble de la concentración de NaCl determinada como CMC (Tabla 1).

Tabla 4. Crecimiento de *Deinococcus sp.* UDEC-P1 y *Psychrobacter sp.* UDEC-A5 en MSM+TP suplementado con NaCl y GB.

	Concentración de NaCl (M)					
	Control	0,05	0,1	0,25	0,5	1,0
<i>Deinococcus sp.</i> UDEC-P1 Sin GB	+	+	-	-	-	-
<i>Deinococcus sp.</i> UDEC-P1 GB 1mM	+	+	+	-	-	-
<i>Deinococcus sp.</i> UDEC-P1 GB 5mM	+	+	+	-	-	-
<i>Psychrobacter sp.</i> UDEC-A5 sin GB	+	+	+	+	-	-
<i>Psychrobacter sp.</i> UDEC-A5 GB 1mM	+	+	+	+	+	-
<i>Psychrobacter sp.</i> UDEC-A5 GB 5mM	+	+	+	+	+	-

Figura 5. Cinética de crecimiento de *Psychrobacter sp.* UDEC-A5 en MSM+TP, suplementado con NaCl en presencia de 5mM de GB.



Se observó que, la cepa bacteriana en MSM+TP a 20°C suplementada con 5mM de GB, alcanzó en 40h la fase estacionaria con un valor de 8.6 log UFC/ml, en comparación a la condición control (MSM+TP a 20°C), que alcanzó la fase estacionaria luego de 100h de cultivo, y una concentración bacteriana 1 log menor. Por otro lado, se observó que GB aumentó el recuento viable de la bacteria cuando fue cultivada en 0.5M NaCl, con una velocidad de crecimiento de 0.011, en comparación a los tratamientos sin GB. Sin embargo, la concentración de GB que se utilizó (5mM), no es capaz de aumentar el recuento bacteriano en 1M NaCl, manteniendo el recuento bacteriano desde el inicio al final de la curva en los tratamientos de 1M NaCl en ausencia o presencia de 5mM de GB.

Tabla 5. Velocidad de crecimiento de *Psychrobacter* sp. UDEC-A5 en presencia de GB 5mM.

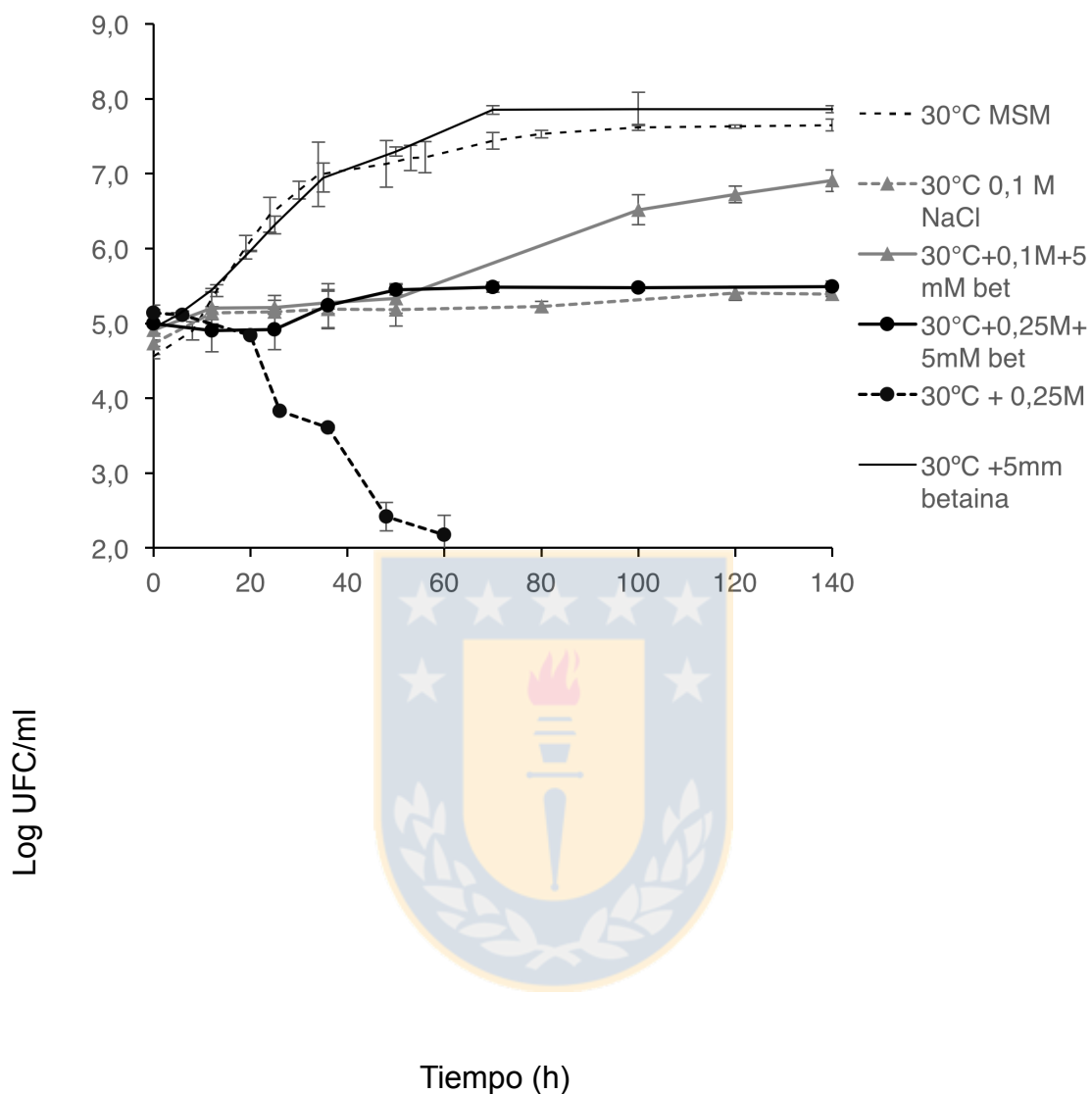



Figura 6. Cinética de crecimiento de *Deinococcus* sp. UDEC-P1 en MSM+TP, suplementado con NaCl en presencia de 5mM de GB. Comparación de las cinéticas de crecimiento en presencia de 5mM de GB, con respecto a las curvas de crecimiento obtenidas sin el osmoprotector.

Se observó que al suplementar con 5mM de GB, disminuyó el tiempo requerido para alcanzar la fase estacionaria (70h), en comparación a las 80h del control (30°C MSM+TP). Por otro lado, se observó que 5mM de GB suplementada al cultivo de 0.1M NaCl, presentó un aumento en el recuento viable, junto con una

velocidad de crecimiento de 0.0112, en comparación a la curva en las mismas condiciones sin GB. En esta última condición, la bacteria mantiene su recuento a lo largo de las 140h del experimento. Adicionalmente, se detectó que al suplementar con GB 5mM la condición de cultivo 0.25M NaCl, se mantiene el recuento bacteriano durante las 140h del experimento. En esta condición, (0.25M NaCl), pero en ausencia de GB, se observó muerte celular bacteriana.

Tabla 6. Velocidades de crecimiento *Deinococcus* sp. UDEC-P1 en presencia de GB (5mM).



	(Log UFC/ml)*min ⁻¹
30°C MSM	0,03961
30°C MSM+0.1M NaCl	-
30°C MSM+0.05M NaCl	0,00761
30°C MSM+0.1M NaCl+GB	0,01119
30°C MSM+0.05M NaCl+GB	0,03850
30°C MSM+0.25M NaCl+GB	-
30°C MSM+GB	0,03943

5.4 Actividad metabólica con sal de tetrazolium WST-1.

5.4.1 Actividad metabólica con sal de tetrazolium WST-1 en *Psychrobacter* sp. UDEC-A5.

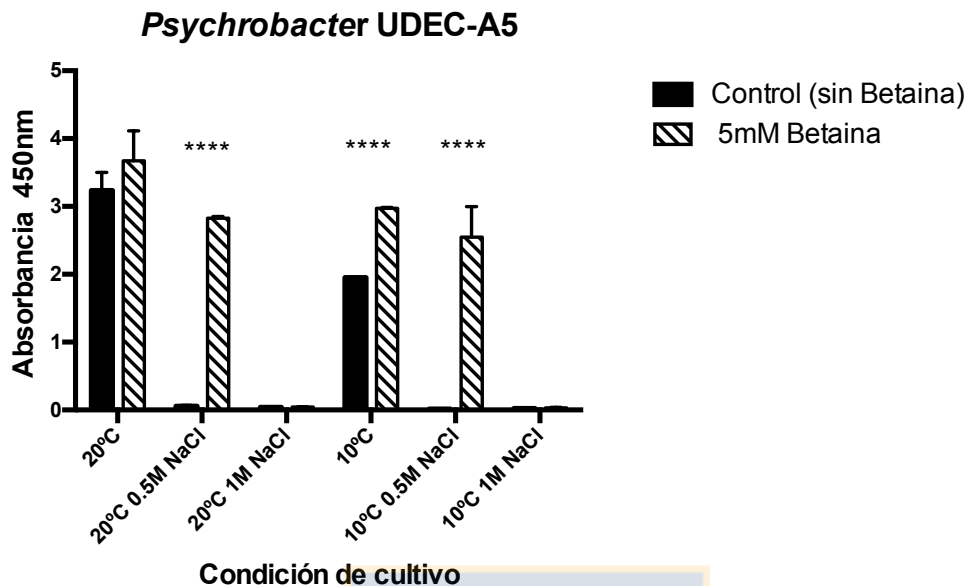


Figura. 7 Efecto de NaCl sobre la actividad metabólica de *Psychrobacter* sp. UDEC-A5. Se determinó mediante la reducción de sal de tetrazolium WST-1 en ausencia y presencia de 5mM GB.

La actividad metabólica de la cepa *Psychrobacter* sp. UDEC-A5 en MSM+TP, a 450nm para los tratamientos control a 20°C y 10°C fueron los únicos que mostraron valores positivos, 3.23 y 1.95, respectivamente (barras negras). Para ambas temperaturas el estrés osmolar con NaCl (0.5 ó 1M) disminuyó la actividad metabólica a valores no detectables. Los valores de la actividad metabólica al suplementar con GB (5mM) los tratamientos a 20°C ó 10°C, presentaron un aumento en la actividad metabólica sin diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto al control a 20°C sin GB. Sin embargo, en el tratamiento a 10°C la adición de GB mostró diferencias muy significativas ($p < 0.025$), con respecto al tratamiento a 10°C sin el osmoprotector. Por otro lado, al suplementar con 5mM de GB se mantuvo la actividad metabólica en concentraciones de 0.5M NaCl, a 10°C y 20°C. Los análisis estadísticos indicaron una diferencia muy significativa ($p < 0.025$) con respecto a ambas temperaturas controles en ausencia de GB para las concentraciones 0.5M NaCl, en donde la actividad metabólica fue indetectable. No se observó diferencia

significativa ($p>0.05$) entre los tratamientos a 10°C suplementados con 5mM de GB y 5mM de GB con 0.5M NaCl. Adicionalmente, al comparar estos dos últimos tratamientos con el control a 20°C (MSM+TP) no se observaron diferencias significativas ($p>0.05$). Sin embargo, una concentración de 5mM GB no fue capaz de mantener la actividad metabólica de la bacteria a concentraciones de 1M de NaCl en 20°C ni 10°C.

5.4.2 Actividad metabólica con sal de tetrazolium WST-1 en *Deinococcus* sp. UDEC-P1.

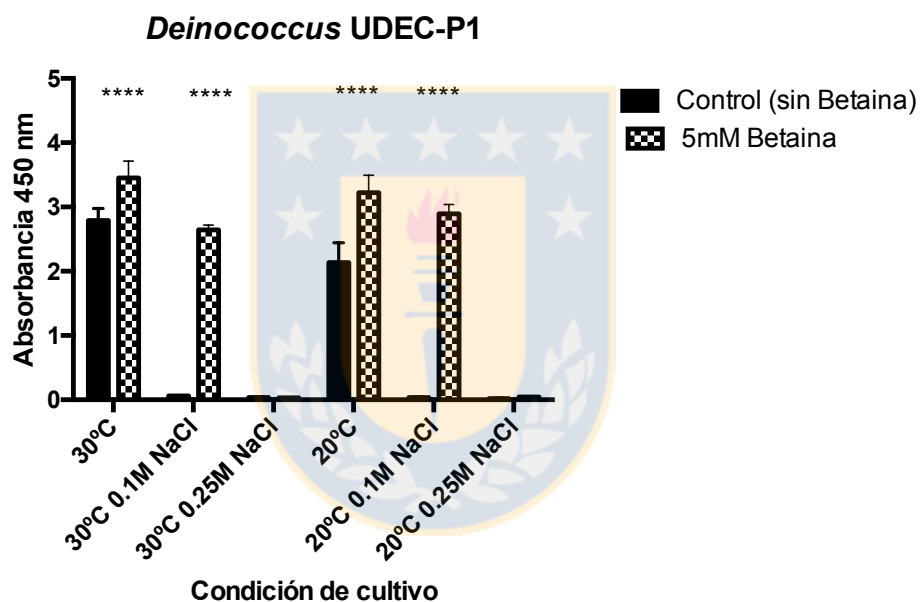
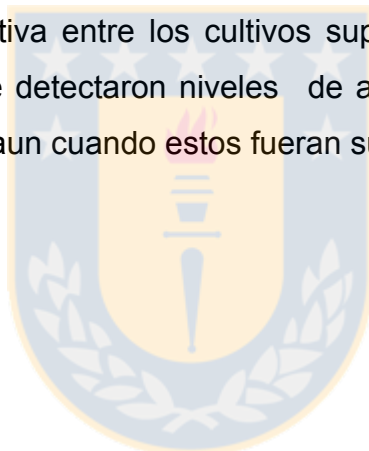


Figura 8. Efecto de NaCl sobre la actividad metabólica de *Deinococcus* sp. UDEC-P1. Se determinó mediante la reducción de sal de tetrazolium WST-1, en ausencia y presencia de 5mM GB en MSM+TP a 450nm.

Los controles a 30°C y 20°C (barras negras) de la actividad metabólica de *Deinococcus* sp. UDEC-P1 en fueron los únicos que mostraron valores positivos. En ambas temperaturas (20°C ó 30°C) el estrés osmolar con 0.1M ó 0.25M de NaCl disminuyó la actividad metabólica a niveles no detectables. Los niveles de actividad

metabólica de los controles a 30°C ó 20°C cuando fueron suplementados con 5mM de GB fueron detectables, con valores de (3.453 y 3.33), respectivamente. Con valores cuyas diferencias fueron muy significativas ($p < 0.025$) con respecto a su respectivo control sin osmoprotector. Al comparar la actividad metabólica en MSM +TP a 20°C y 5mM de GB, con respecto al control (30°C MSM+TP) no se detectaron diferencias significativas en la actividad metabólica.

Por otro lado, la GB permitió mantener la actividad metabólica en concentraciones de 0.1M de NaCl, en ambas temperaturas (20°C ó 30°C). Observándose una diferencia muy significativa ($p < 0.025$) con respecto al control en ausencia de GB para las concentraciones 0.1M, en donde no se detectó actividad metabólica. Además, no se observó diferencia significativa entre los cultivos suplementados con GB a 20°C y 30°C. Por otro lado, no se detectaron niveles de actividad metabólica en cultivos bacterianos a 0.25M NaCl, aun cuando estos fueran suplementados con 5mM de GB, a 30°C ó 20°C.



5.5 Efecto de variación en la concentración de GB y NaCl sobre la actividad metabólica.

5.5.1 Efecto de variación en la concentración de GB y NaCl sobre la actividad metabólica de *Psychrobacter* sp. UDEC A-5

Psychrobacter UDEC-A5

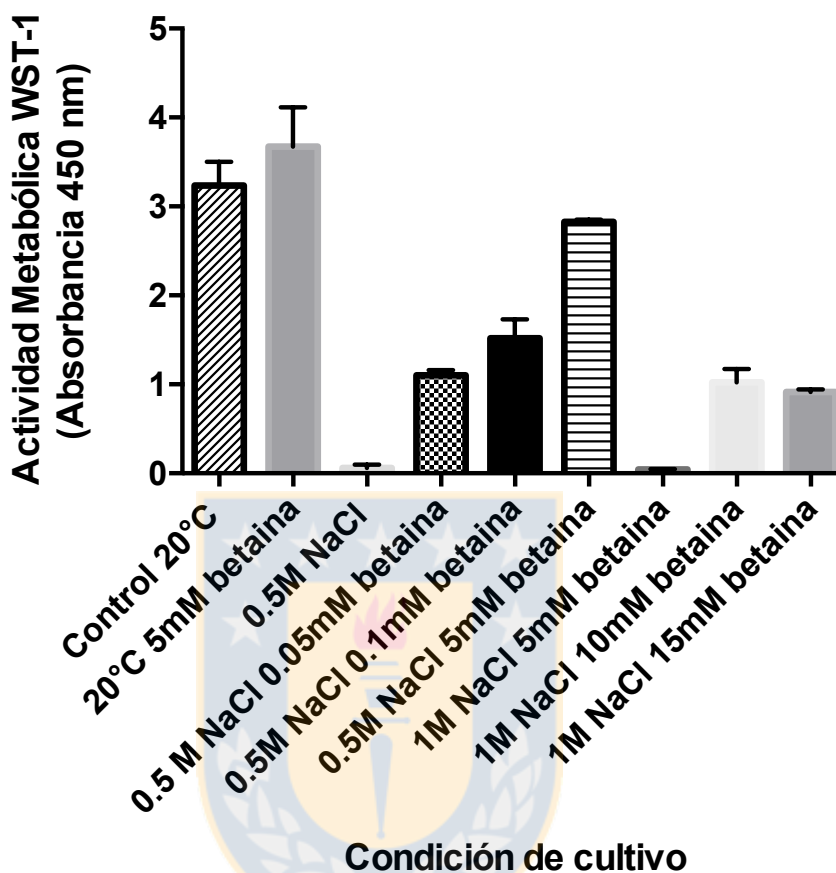


Figura 9. Efecto de variación en la concentración de GB y NaCl sobre la actividad metabólica de *Psychrobacter* sp. UDEC A-5 a 20°C en MSM+TP. Se determinó mediante reducción de sal de tetrazolium WST-1. Se determinó la actividad metabólica en los tratamientos con 0.5M NaCl suplementados con 0.05 mM ó 0.1 mM de GB. Y en tratamientos con 1M NaCl suplementados con 10mM ó 15mM de GB.

El medio MSM+TP con 0.5M NaCl se suplementó con GB 0.05mM ó 0.1mM, estas concentraciones correspondieron a valores de GB 100 y 50 veces inferiores a las estudiadas anteriormente, y fueron suficientes para mantener el metabolismo bacteriano, el cual fue detectado con valores de absorbancia de 1.1 y 1.52, respectivamente. Sin embargo, el valor de actividad metabólica en estos tratamientos

con GB disminuyó 3 y 2.5 veces, con respecto a la concentración de GB usada como control (5mM). En la fig. 7 se observó que una concentración 5mM de GB no es suficiente para mantener la actividad metabólica de *Psychrobacter* sp. UDEC-A5 en el MSM+TP con 1M NaCl. Se duplicó y triplicó las concentraciones de GB (10 y 15mM) y se observó un aumento en la actividad metabólica, con ambas concentraciones, de manera significativa ($p>0.025$), con respecto a 5mM, con valores de 1.01y 0.95, respectivamente. Sin embargo, no se observan diferencias significativas en la actividad metabólica detectada a 10mM ó 15mM de GB.



5.5.2 Efecto de variación en la concentración de GB y NaCl sobre la actividad metabólica de *Deinococcus* sp. UDEC-P1.

Deinococcus UDEC-P1

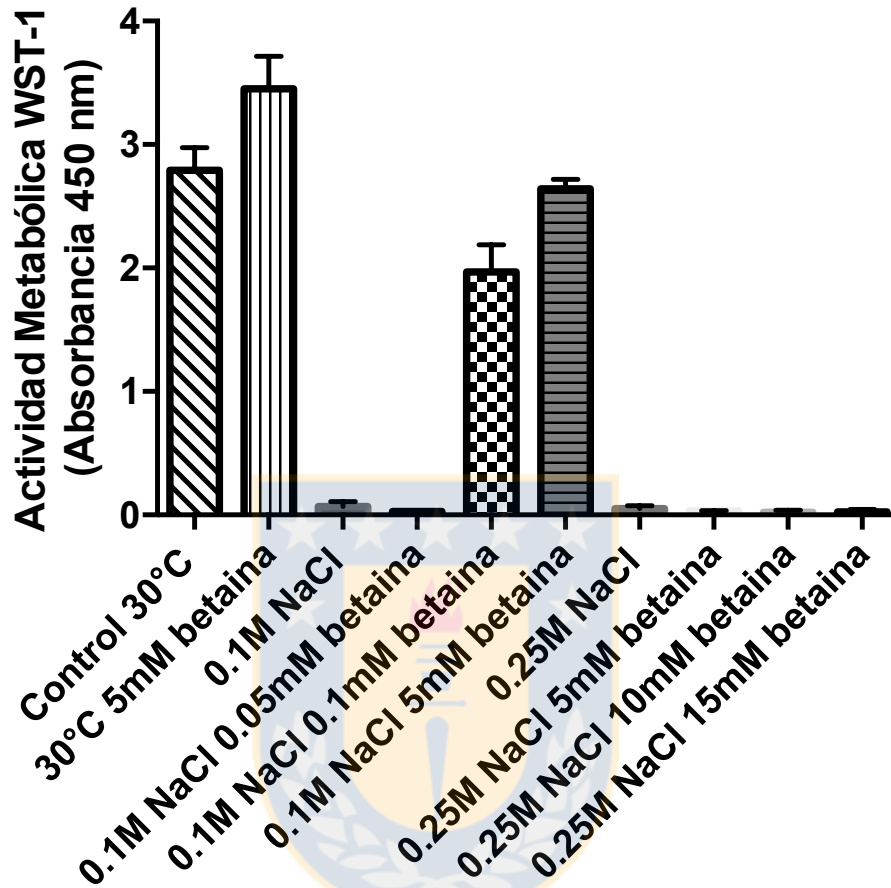


Figura **1 0 .**
Efecto **d e**

variación en la concentración de GB y NaCl sobre la actividad metabólica de *Deinococcus* sp. UDEC-P1 a 30°C en MSM+TP. Se determinó mediante reducción de sal de tetrazolium WST-1. Se determinó la actividad metabólica en tratamientos con 0.1M NaCl suplementados con 0.05 mM ó 0.1 mM de GB. Y en tratamientos con 0.25M NaCl suplementados con 10mM ó 15mM de GB.

El medio MSM+TP con 0.1M NaCl se suplementó con GB 0.05mM ó 0.1mM. Estas concentraciones correspondieron a valores de GB 100 y 50 veces inferiores a las estudiadas anteriormente. 0.1mM de GB mantuvo el metabolismo bacteriano de *Deinococcus* sp. UDEC-P1, el cual fue detectado con un valor de 1.96. Sin embargo,

el valor de actividad metabólica en este tratamiento con GB disminuyó a un tercio, con respecto a la concentración de GB usada como control (5mM). Sin embargo, cuando la concentración de GB disminuyó 100 veces, no se detectó actividad metabólica. Por otro lado, en MSM+TP con 0.25M NaCl las concentraciones de 5mM, 10mM y 15mM de GB no fueron suficientes para mantener la actividad metabólica de *Deinococcus* sp. UDEC-P1.

5.6 Efecto de NaCl sobre concentración celular bacteriana.

5.6.1. Efecto de NaCl sobre concentración celular bacteriana de *Psychrobacter* sp. UDEC A-5.

Los resultados indicaron que, al suplementar GB al inicio del experimento, y luego de 70h de incubación suplementar con 0,5M NaCl, la actividad metabólica de *Psychrobacter* sp. UDEC A-5 fue menor significativamente ($p < 0.05$) a la comparada cuando ambos compuestos son agregados simultáneamente desde el inicio del experimento. En ausencia de GB, no se detectó reducción de la sal de tetrazoluim, en los tratamientos suplementados con 0,5M NaCl al inicio del experimento. Sin embargo, cuando 0,5M NaCl fue suplementado luego de 70h de incubación, la actividad metabólica alcanzó valores de absorbancia de 2, los cuales presentan diferencias muy significativas ($p < 0.025$) entre ambos resultados. Adicionalmente, se compararon los tratamientos suplementados con 0,5M NaCl luego de 70h de cultivo, y no se detectaron diferencias significativas entre los valores de actividad metabólica en presencia o ausencia de 5mM de GB.

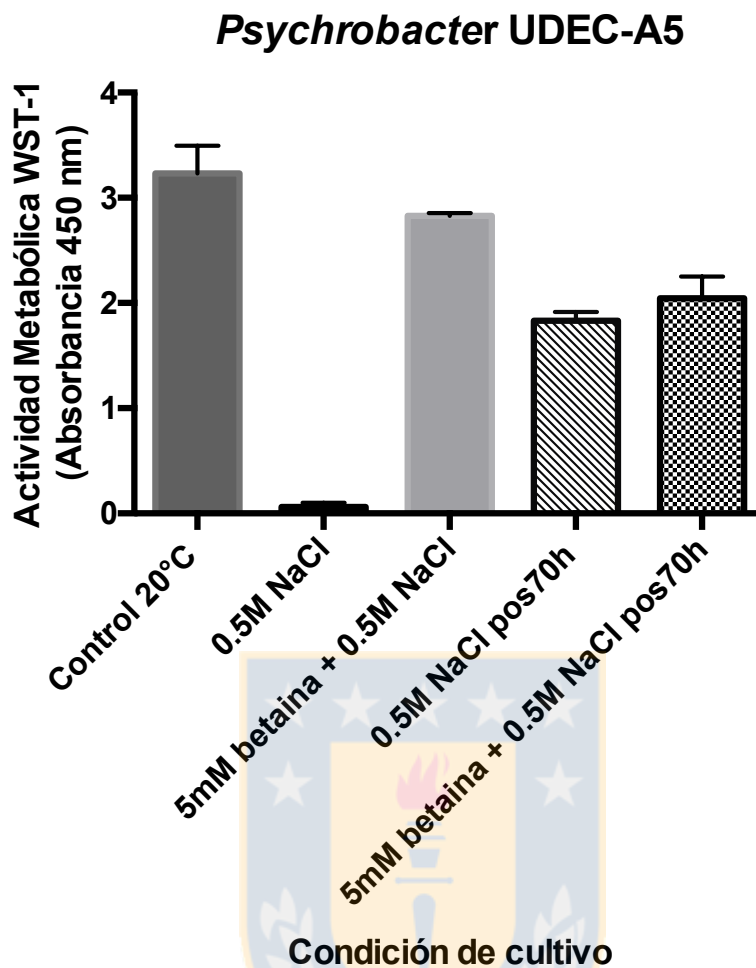


Figura
N a C I
actividad
distintos

11. Efecto de
sobre la
metabólica en
estados de

crecimiento de *Psychrobacter* sp. UDEC A-5. Se determinó la actividad metabólica de *Psychrobacter* sp. UDEC A-5, luego de 120h de cultivo a 20°C en MSM+TP , determinada mediante reducción de sal de tetrazolium WST-1, y suplementado con GB desde el inicio del experimento, y adición de 0.5M NaCl luego de 70h de incubación.

5.6.2. Efecto de NaCl sobre concentración celular bacteriana de *Deinococcus* sp. UDEC-P1.

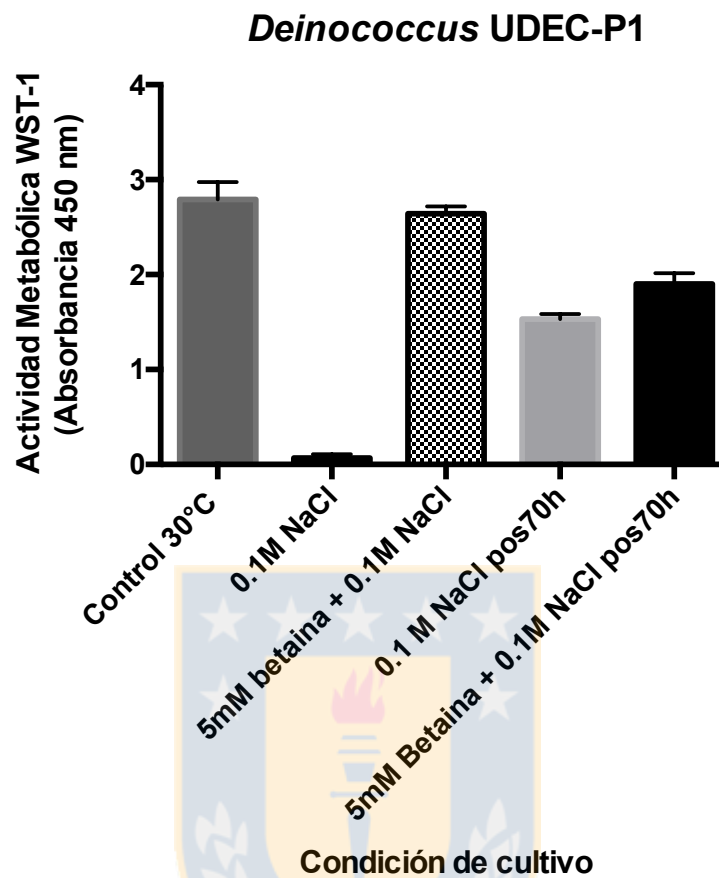


Figura 12. Efecto de NaCl sobre la actividad metabólica en distintos estados de crecimiento de *Deinococcus* sp. UDEC P-1. Se determinó la actividad metabólica de *Deinococcus* sp. UDEC P-1, luego de 120h de cultivo a 30°C en MSM+TP , determinada mediante reducción de sal de tetrazolium WST-1, y suplementado con GB desde el inicio del experimento, y se adicionó 0.1M NaCl luego de 70h de incubación.

Los resultados indicaron que, al suplementar GB al inicio del experimento, y luego de 70h de incubación suplementar con 0.1M NaCl, la actividad metabólica de *Deinococcus* sp. UDEC-P1 es menor a la comparada cuando ambos compuestos son agregados juntos al inicio del experimento, observándose diferencias significativas ($p < 0.05$) entre estos tratamientos. En ausencia de GB, no se detectó

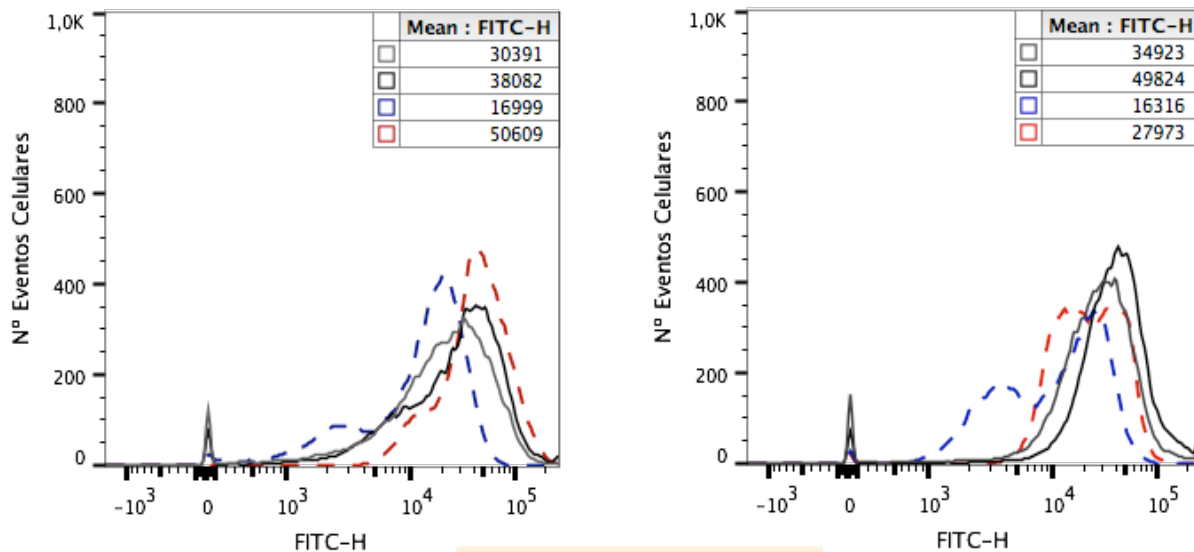
reducción de la sal de tetrazolium, en los tratamientos suplementados con 0.1M NaCl a l inicio del experimento. Sin embargo, cuando 0.1M A NaCl es suplementada luego de B 70h de incubación, la actividad metabólica alcanza valores de absorbancia de 1,5, los cuales presentan diferencias muy significativas ($p < 0.025$) entre ambos resultados. Adicionalmente, se compararon los tratamientos suplementados con 0,1M NaCl luego de 70h de cultivo, y se detectaron diferencias significativas entre los valores de actividad metabólica en presencia o ausencia de 5mM de GB, además en ambos casos se observó menor actividad metabólica al control (30°C).

5.7 Análisis mediante citometría de flujo.

5.7.1 Intensidad de Fluorescencia de *Psychrobacter* sp. UDEC-A5.

El control incubado a 20°C presentó un valor de intensidad de fluorescencia verde de 30391 ± 273 , el cual aumentó a 38082 ± 12775 cuando la célula bacteriana fue cultivada en el mismo medio y temperatura, pero suplementada con 5 mM de GB. Por otro lado, el tratamiento con 0.5M de NaCl mostró una disminución de la actividad metabólica de 16999 ± 320 . Sin embargo, cuando la bacteria fue cultivada en presencia de 0.5M NaCl y suplementada con 5mM de GB, la intensidad de fluorescencia (IF) aumentó 3 veces (50609 ± 6373), en comparación con el tratamiento con 0.5M NaCl y ausencia de GB. Además, al suplementar los tratamientos con GB y 0.5M NaCl la IF fue superior al 1.6 veces mayor al valor del control.

Figura 13. Histogramas de los estados metabólicos de *Psychrobacter* sp. UDEC-A5 a 20°C y 10°C. Se determinó mediante citometría de flujo mediante la tinción RGS.



En la imagen A: Histogramas de intensidad de fluorescencia a 20°C en MSM+TP (plomo), 20°C en MSM+TP suplementado con 5mM GB (negro), 20°C en MSM+TP suplementado con 0.5M NaCl (azul), 20°C en MSM+TP suplementado con 0.5M NaCl y 5mM de GB (rojo). En la imagen B: Histogramas de intensidad de fluorescencia a 10°C en MSM+TP (plomo), 10°C en MSM+TP suplementado con 5mM GB (negro), 10°C en MSM+TP suplementado con 0.5M NaCl (azul), 10°C en MSM+TP suplementado con 0.5M NaCl y 5mM de GB (rojo).

El control cultivado a 10°C presentó un valor de intensidad de fluorescencia verde de 34884 ± 5543 , valor que aumentó 1.5 veces (49824 ± 3014), cuando la célula bacteriana fue cultivada en el mismo medio y temperatura, pero suplementada con 5 mM de GB. Por otro lado, el tratamiento con 0.5M de NaCl mostró una disminución de la IF a 16316 ± 2093 . Sin embargo, cuando la bacteria fue cultivada en presencia de 0.5M NaCl y suplementada con 5mM de GB, la IF aumentó 2 veces (27973 ± 6599), en comparación al tratamiento con NaCl y ausencia de GB y con valores cercanos al control. Por otro lado, los experimentos con estrés por

temperatura, a 10°C, indicaron que la IF a 10°C no mostró diferencias significativas con respecto al tratamiento a 20°C, con $p < 0.05$.

5.7.2 Tamaño celular relativo de *Psychrobacter* sp. UDEC-A5.

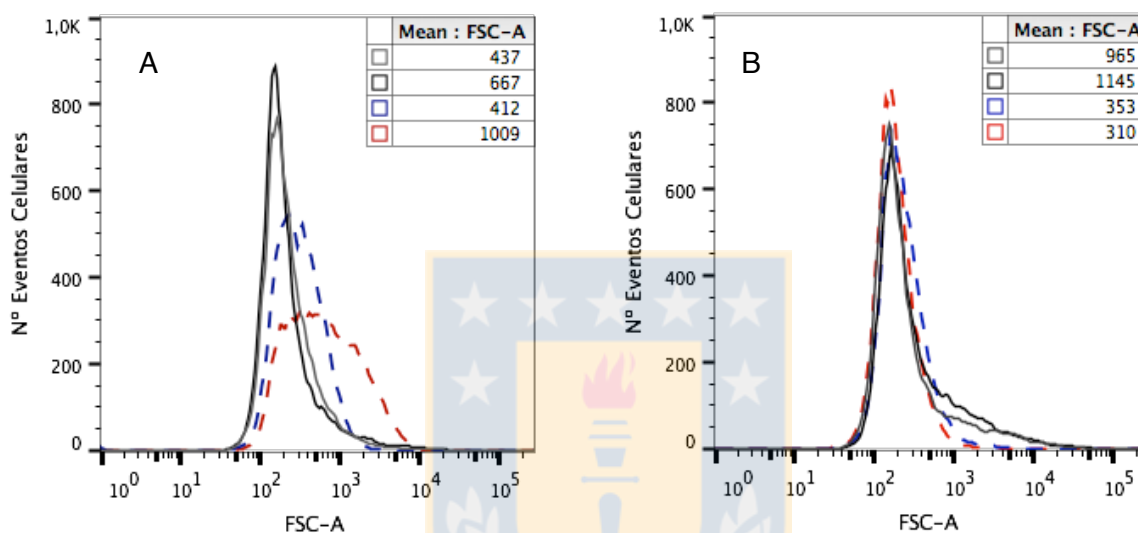


Figura 14. Histogramas de los tamaños celulares de *Psychrobacter* sp. UDEC-A5 a 20°C y 10°C. Se determinó mediante citometría de flujo. En la imagen A: Histogramas de tamaños celulares relativos a 20°C en MSM+TP (plomo), 20°C en MSM+TP suplementado con 5mM GB (negro), 20°C en MSM+TP suplementado con 0.5M NaCl (azul), 20°C en MSM+TP suplementado con 0.5M NaCl y 5mM de GB (rojo). En la imagen B: Histogramas de tamaños celulares relativos a 10°C en MSM+TP (plomo), 10°C en MSM+TP suplementado con 5mM GB (negro), 10°C en MSM+TP suplementado con 0.5M NaCl (azul), 10°C en MSM+TP suplementado con 0.5M NaCl y 5mM de GB (rojo).

El control incubado a 20°C presentó un tamaño celular relativo de 437 ± 99 , valor que se duplicó (667 ± 209), cuando la célula bacteriana fue cultivada en el

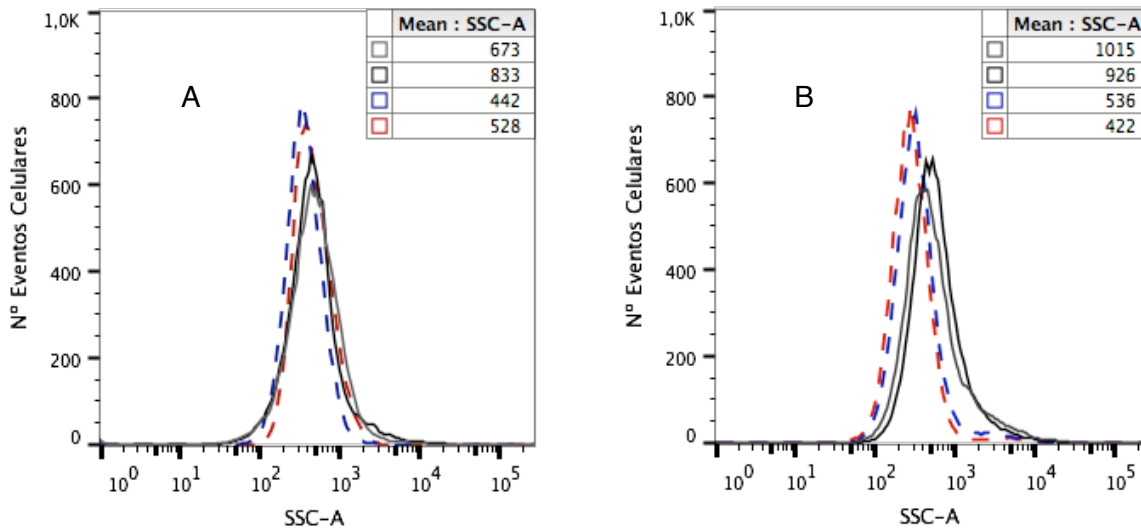
mismo medio y temperatura, pero suplementada con 5 mM de GB. Por otro lado, el tratamiento con 0.5M de NaCl no mostró diferencias con respecto al control (413 ± 89). Sin embargo, cuando la bacteria fue cultivada en presencia de 0.5M NaCl y suplementada con 5mM de GB, el tamaño celular relativo aumentó 3.4 veces (1010 ± 230), en comparación al control y al tratamiento con NaCl y ausencia de GB.

El control incubado a 10°C presentó un tamaño celular relativo de 965 ± 364 , valor que aumentó a 1145 ± 406 cuando la célula bacteriana fue cultivada en el mismo medio y temperatura, pero suplementada con 5 mM de GB. Por otro lado, el tratamiento con 0.5M de NaCl mostró una disminución de 3 veces del tamaño celular relativo en comparación al control (354 ± 52). Sin embargo, cuando la bacteria fue cultivada en presencia de 0.5M NaCl y suplementada con 5mM de GB, el tamaño celular relativo se mantuvo con respecto al tratamiento sin GB (310 ± 44), pero disminuyó 3 veces en comparación al control.

5.7.3 Complejidad Citoplasmática relativa de *Psychrobacter* sp. UDEC-A5.

El control incubado a 20°C presentó una complejidad celular relativa de 673 ± 123 , valor que aumentó 1.7 veces (833 ± 129), cuando la célula bacteriana fue cultivada en el mismo medio y temperatura, pero suplementada con 5 mM de GB. Por otro lado, el tratamiento con 0.5M de NaCl disminuyó la complejidad (442 ± 38) en comparación al control. Cuando la bacteria fue cultivada en presencia de 0.5M NaCl y suplementada con 5mM de GB, la complejidad celular relativa fue de 528 ± 37 , disminuyendo con respecto al control.

Figura 15. Histogramas de la complejidad citoplasmática celular de *Psychrobacter* sp. UDEC-A5 a 20°C y 10°C . Se determinó mediante la técnica citometría de flujo. En



la imagen A: Histogramas de complejidad citoplasmática celular a 20°C en MSM+TP (plomo), 20°C en MSM+TP suplementado con 5mM GB (negro), 20°C en MSM+TP suplementado con 0.5M NaCl (azul), 20°C en MSM+TP suplementado con 0.5M NaCl y 5mM de GB (rojo). En la imagen B: Histogramas de complejidad citoplasmática celular a 10°C en MSM+TP (plomo), 10°C en MSM+TP suplementado con 5mM GB(negro), 10°C en MSM+TP suplementado con 0.5M NaCl (azul), 10°C en MSM +TP suplementado con 0.5M NaCl y 5mM de GB (rojo).

El control incubado a 10°C presentó una complejidad celular relativa de 1015 ± 217 , valor sin diferencias significativas (926 ± 129), cuando la célula bacteriana fue cultivada en el mismo medio y temperatura, pero suplementada con 5 mM de GB. Por otro lado, el tratamiento con 0.5M de NaCl disminuyó la complejidad 2 veces (536 ± 38) en comparación al control. Cuando la bacteria fue cultivada en presencia de 0.5M NaCl y suplementada con 5mM de GB, la complejidad celular relativa fue de 422 ± 37 , disminuyendo 2.4 veces con respecto al control.

5.7.4 Intensidad de Fluorescencia de *Deinococcus* sp. UDEC-P1

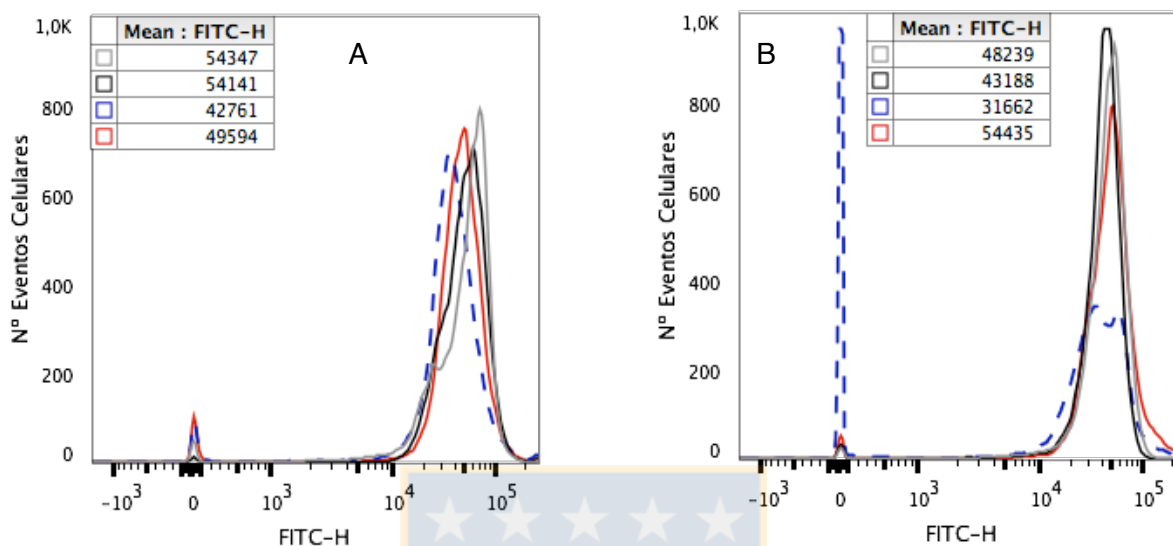


Figura 16. Histogramas de los estados metabólicos de *Deinococcus* UDEC-P1 a 30°C y 20°C. Se determinó mediante citometría de flujo mediante RGS. En la imagen A: Histogramas de intensidad de fluorescencia a 30°C en MSM+TP (plomo), 30°C en MSM+TP suplementado con 5mM GB (negro), 30°C en MSM+TP suplementado con 0.1M NaCl (azul), 30°C en MSM+TP suplementado con 0.1M NaCl y 5mM de GB (rojo). En la imagen B: Histogramas de intensidad de fluorescencia a 20°C en MSM+TP (plomo), 20°C en MSM+TP suplementado con 5mM GB (negro), 20°C en MSM+TP suplementado con 0.1M NaCl (azul), 20°C en MSM+TP suplementado con 0.1M NaCl y 5mM de GB (rojo).

El control incubado a 30°C presentó un valor de intensidad de fluorescencia (IF) verde de 54347 ± 1526 , valor que se mantuvo constante (54141 ± 13514), cuando la célula bacteriana fue cultivada en el mismo medio y temperatura, pero suplementada con 5 mM de GB. Por otro lado, el tratamiento con 0.1M de NaCl mostró una disminución de la IF a 42761 ± 1558 , 1.4 veces menor que el control. Sin

embargo, cuando la bacteria fue cultivada en presencia de 0.1M NaCl y suplementada con 5mM de GB, la IF aumentó a 49594 ± 7282 .

El control incubado a 20°C presentó un valor de intensidad de fluorescencia verde de 48239 ± 6887 , valor similar (43240 ± 1349), se detectó cuando la célula bacteriana fue cultivada en el mismo medio y temperatura, pero suplementada con 5 mM de GB. Por otro lado, el tratamiento con 0.1M NaCl mostró una disminución de la IF a 31662 ± 2697 , 1.4 veces menor al control. Sin embargo, cuando la bacteria fue cultivada en presencia de 0.1M NaCl y suplementada con 5mM de GB, la IF aumentó a 54435 ± 12400 , actividad metabólica mayor al control y al ser suplementada con GB.

5.7.5 Tamaño celular relativo de *Deinococcus* sp. UDEC-P1

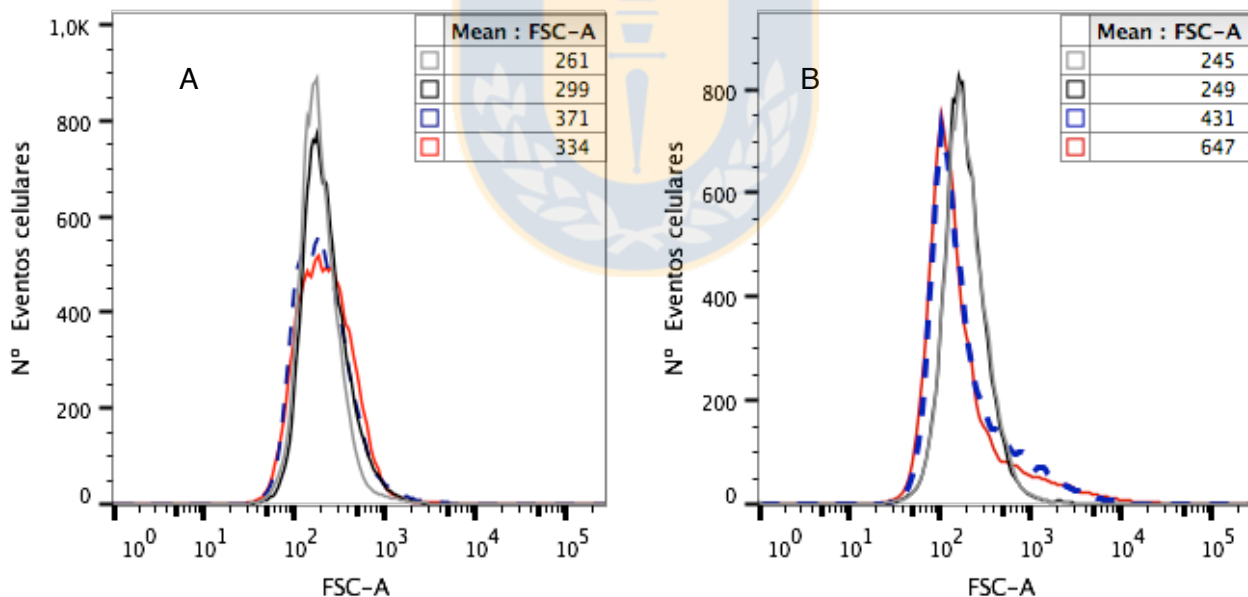


Figura 17. Histogramas de los tamaños celulares relativos de *Deinococcus* UDEC-P1 a 30°C y 20°C. Se determinó mediante la técnica citometría de flujo. En la imagen A: Histogramas de tamaño celular relativo a 30°C en MSM+TP (plomo), 30°C en

MSM+TP suplementado con 5mM GB (negro), 30°C en MSM+TP suplementado con 0.1M NaCl (azul), 30°C en MSM+TP suplementado con 0.1M NaCl y 5mM de GB (rojo). En la imagen B: Histogramas de tamaño celular relativo a 20°C en MSM+TP (plomo), 20°C en MSM+TP suplementado con 5mM GB (negro), 20°C en MSM+TP suplementado con 0.1M NaCl (azul), 20°C en MSM+TP suplementado con 0.1M NaCl y 5mM de GB (rojo).

El control a 30°C presentó un tamaño celular relativo de 261 ± 5 , valor que aumentó a 299 ± 52 , cuando la célula bacteriana fue cultivada en el mismo medio y temperatura, pero suplementada con 5 mM de GB. Por otro lado, el tratamiento con 0.1M NaCl mostró un aumento de 1.4 del tamaño celular relativo en comparación al control. (371 ± 9). Cuando la bacteria fue cultivada en presencia de 0.1M NaCl y suplementada con 5mM de GB, el tamaño celular relativo aumentó 1.6 veces (334 ± 52), en comparación al control, y se mantuvo constante con respecto al tratamiento con 0.1M NaCl.

El control incubado a 20°C presentó un tamaño celular relativo de 245 ± 47 , valor que se mantuvo constante (249 ± 132), cuando la célula bacteriana fue cultivada en el mismo medio y temperatura, pero suplementada con 5 mM de GB. Por otro lado, el tratamiento con 0.1M NaCl mostró un aumento de 1.7 veces del tamaño celular relativo en comparación al control (432 ± 7). Sin embargo, cuando la bacteria fue cultivada en presencia de 0.1M NaCl y suplementada con 5mM de GB, el tamaño celular relativo aumentó a 647 ± 23 , valor 2.6 veces mayor respecto al tratamiento control, y dos veces mayor al tratamiento con 0.1M NaCl.

5.7.6 Complejidad Citoplasmática relativa de *Deinococcus* sp. UDEC-P1.

El control incubado a 30°C presentó una complejidad celular relativa de 436 ± 15 , valor que se mantuvo constante al adicionar 5mM GB al medio (438 ± 9). Por otro lado, el tratamiento con 0.1M NaCl mostró una complejidad intracitoplasmática 2

veces mayor al control (861 ± 61). Cuando la bacteria fue cultivada en presencia de 0.1M NaCl y suplementada con 5mM de GB, la complejidad celular relativa fue de 670 ± 25 , lo que indicó un aumento en la complejidad celular en comparación al control (2.4 veces).

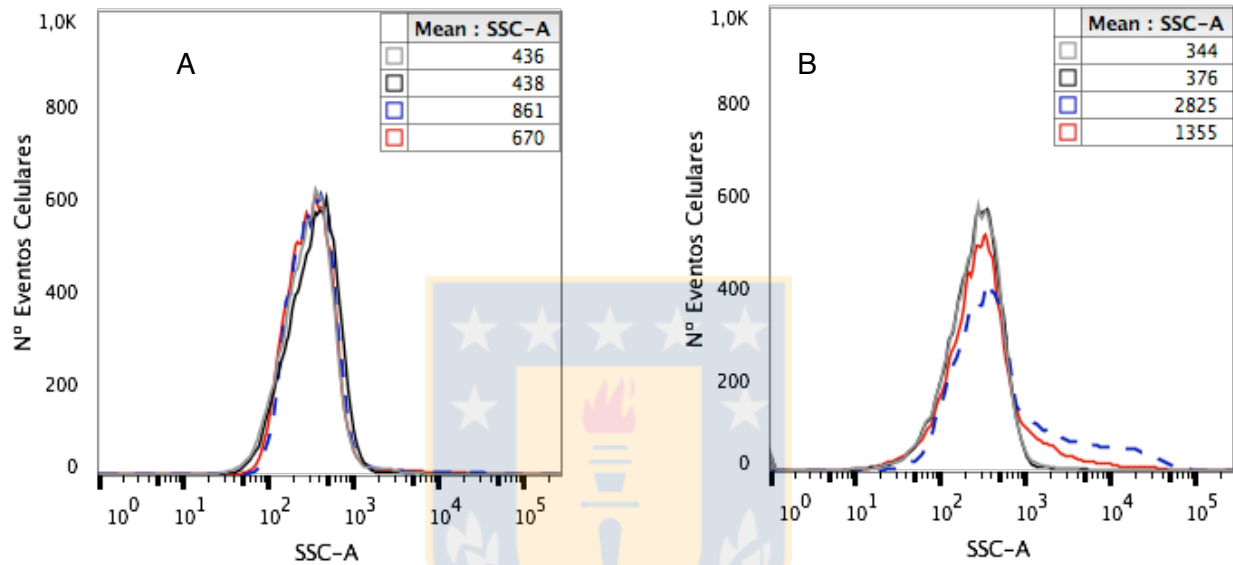


Figura 18. Histogramas de la complejidad citoplasmática celular de *Deinococcus* UDEC-P1 incubada a 30°C ó 20°C. Se determinó mediante la técnica citometría de flujo. En la imagen A: Histogramas de complejidad citoplasmática a 30°C en MSM +TP (plomo), 30°C en MSM+TP suplementado con 5mM GB (negro), 30°C en MSM +TP suplementado con 0.5M NaCl (azul), 30°C en MSM+TP suplementado con 0.5M NaCl y 5mM de GB (rojo). En la imagen B: Histogramas de complejidad citoplasmática a 20°C en MSM+TP (plomo), 20°C en MSM+TP suplementado con 5mM GB (negro), 20°C en MSM+TP suplementado con 0.5M NaCl (azul), 20°C en MSM+TP suplementado con 0.5M NaCl y 5mM de GB (rojo).

El control incubado a 20°C presentó una complejidad celular relativa de 344 ± 56 , valor que se mantiene sin diferencias significativas (376 ± 31), cuando la célula bacteriana fue cultivada en el mismo medio y temperatura, pero suplementada con 5 mM de GB. Por otro lado, el tratamiento con 0.1M NaCl aumentó 9 veces la complejidad celular (2825 ± 230) en comparación al control. Cuando la bacteria fue cultivada en presencia de 0.1M NaCl y suplementada con 5mM de GB, la complejidad celular relativa fue de 1355 ± 102 , aumentando 6 veces con respecto al control.

5.7.7 Intensidad de Fluorescencia de *Psychrobacter* sp. UDEC-A5

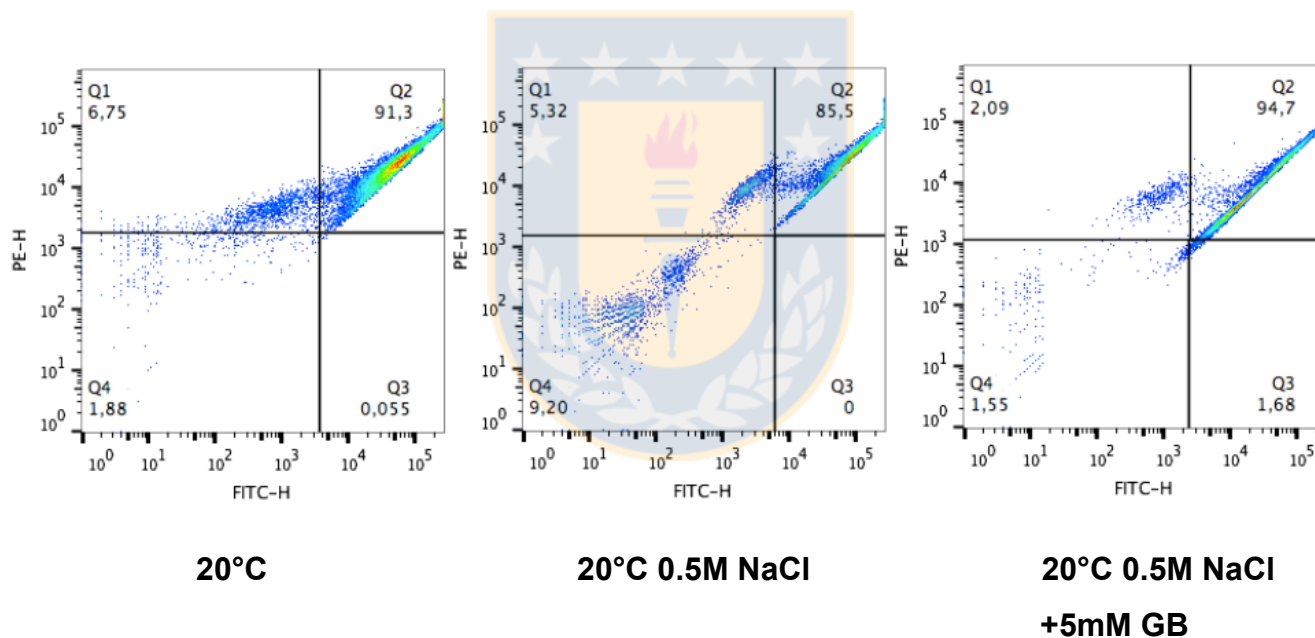


Figura 19. Estado metabólico de *Psychrobacter* sp. UDEC-A5 a 20°C. Se detectó la actividad metabólica (RGS) y la integridad de membrana (PI) para tres tratamientos: 20°C en MSM+TP, 20°C en MSM+TP suplementado con 0.5M NaCl, 20°C en MSM +TP suplementado con 0.5M NaCl y 5mM de GB. Mediante el gráfico se detectaron 4 poblaciones correspondientes en sentido horario: Q1: población marcada con PI, Q2,Q3, población marcada con RGS, Q4: población bacteriana no marcada.

El tratamiento control (20°C) presenta un 6.75% de células marcadas con PI, 91.3% de células marcadas con RGS y 1.88% de células sin marcaje. por otro lado, el tratamiento suplementado con 0.5M NaCl (20°C) presenta un 5.32% de células marcadas con PI, 85.5% de células marcadas con RGS y 9.2 de células sin marcaje. El tratamiento suplementado con 0,5M NaCl y 5mM de glicina-GB (20°C) presenta un 2.09% de células marcadas con PI, 96.4% de células marcadas con RGS y 1.55% de células sin marcaje

5.7.8 Intensidad de Fluorescencia de *Deinococcus* sp. UDEC-P1

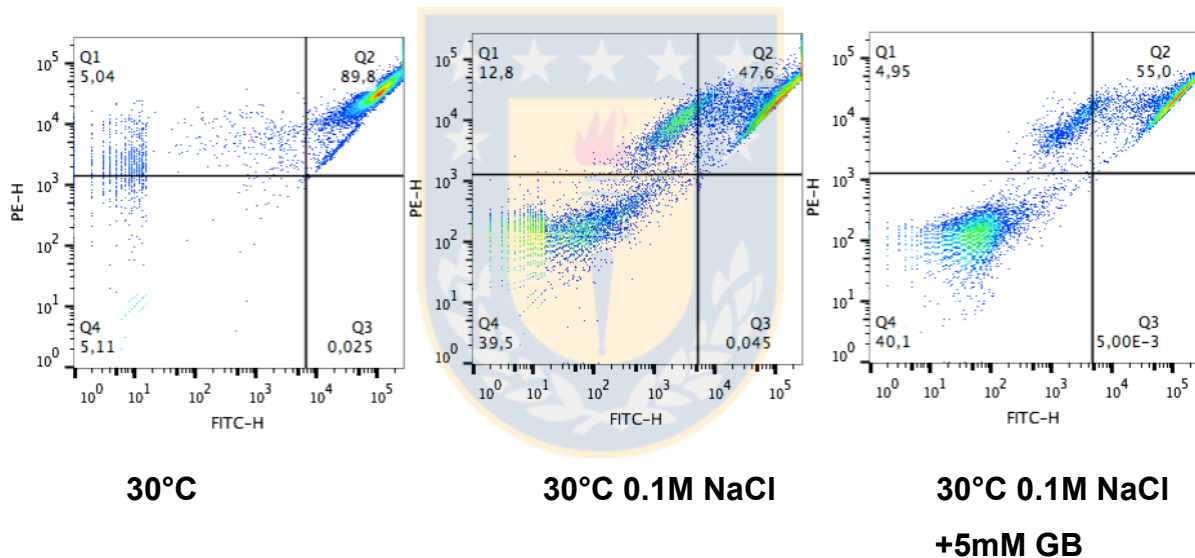


Figura 20. Estado metabólico de *Deinococcus* sp. UDEC-P1 a 30°C. Se detectó la actividad metabólica (RGS) y la integridad de membrana (PI) para tres tratamientos: 30°C en MSM+TP, 30°C en MSM+TP suplementado con 0.1M NaCl, 30°C en MSM +TP suplementado con 0.1M NaCl y 5mM de GB. Se detectaron 4 poblaciones correspondientes en sentido horario, Q1:población marcada con PI, Q2,Q3: población marcada con RGS, Q4: población bacteriana no marcada.

El tratamiento control (30°C) presenta un 5.04 % de células marcadas con PI, 89.9% de células marcadas con RGS y 5.11% de células sin marcaje. por otro lado, el tratamiento suplementado con 0.1M NaCl (30°C) presenta un 12.8 % de células marcadas con PI, 47.6% de células marcadas con RGS y 39.5 de células sin marcaje. El tratamiento suplementado con 0,1M NaCl y 5mM de glicina-GB (30°C) presenta un 4.95 % de células marcadas con PI, 55% de células marcadas con RGS y 40.1 de células sin marcaje



6. DISCUSIÓN

En bacterias los fenómenos de estrés como la alta osmolaridad y la baja temperatura conllevan a respuestas similares. Como por ejemplo, disminución de la tasa de movimientos moleculares, incluyendo cambios conformacionales de proteínas, modificaciones en la estructura secundaria de ácidos nucleicos, pérdida de la actividad de agua y modificación de los lípidos de membrana (Bergholz et al., 2009)

6.1 Efecto osmolar de NaCl.

Los resultados muestran que *Psychrobacter* sp. UDEC-A5, fue capaz de tolerar la presencia de NaCl, esto podría ser explicado debido a que el medio R2A, contribuye con péptidos, aminoácidos libres, bases nitrogenadas, minerales y vitamina. Sustratos, a partir de los cuales, podría sintetizarse el osmoprotector glicina-GB (GB). En efecto, Amato *et. al.*, (2008) describió en *P. cryohalolentis* K5 la presencia de genes para la síntesis *de novo* de GB, a partir de su precursor colina, así como también transportadores para ésta. Además, aminoácidos como prolina o glutamato también poseen propiedades osmoprotectoras los cuales pueden ser aportados por el medio R2A. En consecuencia, la tolerancia a NaCl detectada en esta cepa, en presencia de fuentes de carbono, podría ser explicada por su capacidad para sintetizar *de novo* osmoprotectores como GB. Por su parte, Mykytczuk *et. al.*, (2013) estudiando *P. halocryophilus* detectó una respuesta similar cuando la bacteria fue cultivada en caldo tripticasa de soya, y concentraciones de NaCl mayores a 1.7M. Por tanto, se podría suponer que la tolerancia de *Psychrobacter* sp. UDEC-A5 al estrés osmolar por 1M NaCl, estaría relacionada con la disponibilidad de sustratos a partir de los cuales puede sintetizar GB. En este sentido, los resultados indican que a menor disponibilidad de nutrientes la tolerancia también fue menor, reafirmando lo anterior.

Del mismo modo, estudios realizados por Ponder *et. al.*, (2004) utilizando la *Psychrobacter* sp. cepa 273 indicaron que en un medio compuesto por 10% de tripticasa de soya y NaCl 0.25M, se observó, una inhibición del crecimiento bacteriano. Resultados similares fueron obtenidos en *Psychrobacter* sp. UDEC-A5 cultivada en un medio mínimo suplementado con elementos Traza y piruvato(MSM +TP), en donde el crecimiento celular fue inhibido con 0.5M NaCl, esto es, concentraciones de NaCl 2 veces menores a concentraciones que mostraron ser las inhibitorias en R2A suplementado con NaCl. Adicionalmente, en MSM+TP la concentración 0.5M NaCl se determinó como la concentración mínima inhibitoria para esta cepa. Sin embargo, según el criterio de Pearson, (1980) no se observó muerte celular en concentraciones de hasta 1M NaCl en MSM+TP.

El medio MSM+TP aporta iones que posiblemente actuarían en la respuesta primaria frente a *shock* hiperosmótico, como el ion potasio (K⁺) y aniones, como fosfatos y sulfatos (Welshm, 2000). Sin embargo, esta respuesta fue insuficiente para contrarrestar el efecto deletéreo sobre la bacteria, frente a una exposición a mayores niveles de osmolaridad externa (Wood, 2011). Esto explicaría, la diferente tolerancia a NaCl de la misma bacteria cuando se encuentra expuesta a distintos medios. Así mismo, Wood (2011) describe la respuesta secundaria de la célula bacteriana que comprende la captación y concentración intracelular de moléculas con propiedades osmoprotectoras, cuando la respuesta primaria es insuficiente. Respuesta similar se observó en *Deinococcus* sp. UDEC-P1, al comparar el crecimiento en MSM+TP y en caldo R2A. En donde, la composición del caldo R2A, proporcionaría aminoácidos con capacidades osmoprotectoras, como glutamato o prolina (Welshm, 2000), esto podría explicar el crecimiento de la cepa en concentraciones de 0.1M de NaCl en R2A. Sin embargo, según el criterio de Pearson (1980), en concentraciones mayores de NaCl (0.25M), se produce muerte celular en ambos medios. Esto sugiere, que 0.25M NaCl es una concentración letal para esta bacteria, impidiendo su recuperación en un medio nutritivo sin estrés osmótico, a diferencia de lo encontrado en *Psychrobacter* sp. UDEC-A5.

El diferente nivel de tolerancia frente a NaCl de las cepas estudiadas, indican que *Deinococcus* sp. UDEC-P1, sería más susceptible (5 veces) a la presencia NaCl que *Psychrobacter* sp. UDEC-A5. Esto podría explicarse, puesto que en el género *Psychrobacter*, se ha descrito la presencia de genes que codifican para enzimas para la síntesis de glicina-GB (GB). Sin embargo, estudios del transcriptoma de *Deinococcus radiodurans*, solo han descrito genes codificadores para transportadores de glicina-GB, trehalosa e iones fosfato, pero no genes para la síntesis de *nov*o de GB u otro osmoprotector (Im *et al.*, 2013). Estos antecedentes podrían explicar la menor capacidad para tolerar NaCl en comparación con *Psychrobacter*. Por otro lado, el género *Psychrobacter* ha sido descrito como halotolerante, y en base a lo descrito por Bakermans (2012), los organismos halotolerantes poseen, además, propiedades de criotolerancia, desarrollando respuestas similares para enfrentar ambos tipos de estrés. Esta protección cruzada podría explicar también la mayor velocidad de crecimiento a temperaturas menores (10°C) mostrada por *Psychrobacter* sp. UDEC-A5 comparado con *Deinococcus* sp. UDEC-P1.

Existen pocos reportes de la capacidad de los miembros del género bacteriano *Deinococcus* para sobrevivir en condiciones de mayores niveles de osmolaridad. Shukla *et al.*, (2007) describió la baja tolerancia a NaCl (0.2M) de *Deinococcus radiodurans* y dos aislados del mismo género, no obstante su alta resistencia a radiación gamma y ambientes con reducida actividad de agua, como desecación y congelamiento. Ponder *et al.* (2008), describe la baja actividad de agua intracelular como un fenómeno presente en ambientes de baja temperatura, como también en aquellos con elevada salinidad. Por otro lado, Mattimore y Battista (1995) caracterizan la familia *Deinococcaceae* por su capacidad de resistir los efectos de radiación ionizante. En donde miembros de esta familia han sobrevivido a 5000 Gy de radiación gamma sin perder la viabilidad. Schmid y Lidstrom (2002) sugieren que su capacidad de sobrevivencia se explicaría debido a los mecanismos redundantes de reparación de DNA, como son un sistema de reparaciones ruptura de doble hebra

de DNA y vías reparadoras de excisión de nucleótidos (Ferreira *et al.*, 1997). Esta maquinaria le permitiría resistir diversas condiciones que ocasiona el estrés oxidativo. En base a lo anterior y los resultados obtenidos en esta tesis, la pérdida de viabilidad en *Deinococcus* sp. UDEC-P1 en presencia de NaCl, no solo disminuiría la actividad de agua intracitoplasmática, si no que también podría afectar los mecanismos de reparación del ADN, como fue informado, no descartando que podrían ser afectadas directamente otras macromoléculas que comprometen su viabilidad. En efecto, Im *et al.* (2013) describe en *Deinococcus radiodurans* R1 en presencia de 0.3M de NaCl, la disminución de la expresión del operon *nrdIEF*, el cual codifica para una enzima ribonucleotido reductasa, esencial para la síntesis de DNA. Este efecto deletéreo de NaCl sobre la reparación del DNA, conllevaría a la represión de genes involucrados en el metabolismo, biosíntesis de la pared celular y proteínas. Shukla *et al.* (2007) y Minton (1994), caracterizaron la respuesta de *Deinococcus radiodurans* frente a la reparación del DNA de manera similar para desecación y estrés oxidativo. Estos antecedentes coinciden con los obtenidos en *Deinococcus* sp. UDEC-P1, con resultados similares en sobrevivencia a estrés oxidativo por radiación UV y etanol informados por Fernandez-Bunster (2012) y Mardones (2013).

De manera complementaria se ha descrito, que la célula bacteriana expuesta a distintos estrés ambientales (incluido osmolaridad y estrés oxidativo) activa regulones *target* que estimulan vías de respuestas similares. En efecto, Young *et al.*, (2012) en *Bacillus subtilis*, caracterizó la respuesta frente a estrés con etanol y NaCl, describiendo rutas de respuesta solapadas cuando la bacteria fue expuesta a cada estrés por separado. En base a lo anterior, se sugiere que *Deinococcus* sp. UDEC-P1 podría utilizar vías de respuesta similares para enfrentar diversos tipos de estrés como UV, tal como fue señalado por Fernandez-Bunster *et al.* (2012) y Monsalvez (2015), etanol (Mardones, 2013) y bajas temperaturas (Guerra *et al.*, 2016).

6.2 GB, como osmoprotector de actividad metabólica.

Ambas cepas bacterianas fueron capaces de crecer en presencia de concentraciones inhibitorias de NaCl, cuando se suplementó simultáneamente con concentraciones de 1mM ó 5mM de glicina-GB. En efecto, la función protectora de GB, frente a osmolaridad ha sido demostrado en distintas especies bacterianas como, *Escherichia coli* K-12, (Cayley *et al.*, 1991), *Bacillus subtilis* (Hoffmann *et al.*, 2013). Incluso en eucariontes y arqueas. Welsh (2000), incluyó un listado de los osmoprotectores más utilizados por estos organismos, siendo GB ampliamente utilizada por organismos como: cianobacterias, microalgas, arqueas, actinomicetes, bacterias reductoras de sulfato y bacterias heterotróficas.

En *Deinococcus* sp. UDEC-P1, se detectó que 1mM ó 5mM de GB mantienen viable la cepa en MSM+TP suplementado con 0.25M NaCl, en donde la bacteria disminuyó 3 log su recuento luego de ser cultivada en MSM+TP 0.25M de NaCl. Así, la presencia de GB revierte el efecto deletéreo y no se observó la muerte del cultivo bacteriano según el criterio de Pearson (1980), como fue ocasionado en ausencia de este osmoprotector. Lo que sugiere, que en presencia de GB, *Deinococcus* sp. UDEC-P1, tolera concentraciones mayores de osmolaridad por NaCl.

Ambas cepas, en presencia de Glicina-GB (5mM) mantuvieron los niveles de actividad metabólica cuando fueron expuestas a concentraciones de NaCl que mostraron ser inhibitorias. Sin embargo, en concentraciones mayores de NaCl, la presencia de GB no fue suficiente para mantener la actividad metabólica. Hoffmann *et al.* (2013) utilizando *B. subtilis*, describió la existencia de una relación lineal entre la concentración de prolina intracelular a medida que aumenta la concentración extracelular de NaCl. Sin embargo, los resultados de este estudio fueron diferentes puesto que, mayores concentraciones de glicina-GB, no lograron revertir el efecto inhibitorio sobre la actividad metabólica con mayores niveles de osmolaridad en la cepa *Deinococcus* sp. UDEC-P1. No obstante, en *Psychrobacter* sp. UDEC-P1 los

incrementos en la concentración de GB, mantuvieron la actividad metabólica en presencia de concentraciones inhibitorias de NaCl. Los resultados sugieren también que incrementos de GB no mejoran la protección de la actividad metabólica frente a la presencia de NaCl. En efecto, Hoffmann *et al.* (2013) en *B. subtilis* además, indica que la acumulación de GB intracelular actúa como inhibidor del gen *opuA*, que codifica para la expresión del transportador de GB, generándose un feedback negativo. Por otro lado, Wargo (2013) describe que la concentración intracelular de colina o GB en *Pseudomonas aeruginosa* regula negativamente factores de transcripción asociados a la expresión de transportadores sensibles a estos compuestos. Estos antecedentes podrían explicar por que la adición de mayor concentraciones de GB no revierten el efecto deletéreo del incremento de osmolaridad, que se observó en ambas cepas estudiadas.

Tanto en *Psychrobacter* sp. UDEC-A5, como en *Deinococcus* sp. UDEC-P1, la adición simultánea de GB y NaCl mostró niveles de actividad metabólica similares al control, sugiriendo la posibilidad de que el transporte de GB al interior celular pueda ser incrementado por la presencia de NaCl extracelular. De hecho, Youssef *et al.*, 2014, determinó que en 60 aislados bacterianos pertenecientes a halobacterias la acumulación intracelular de GB era dependiente de la presencia extracelular de NaCl. Situación similar se describe en *P. aeruginosa*, donde el transporte de GB es dependiente de la osmolaridad del medio (Wargo, 2013).

Glicina betaina, además de actuar como osmoprotector, permitiría el aumento de la actividad metabólica en la cepa *Psychrobacter* sp. UDEC-A5, a temperaturas 10°C inferiores al control (20°C), así podría restaurar el nivel del metabolismo bacteriano en condiciones de estrés térmico. Ocurre lo mismo con *Deinococcus* sp. UDEC-P1 a 20°C, lo que sugiere que, además de ser osmoprotector en las cepas estudiadas, también ejercería función crioprotector.

En *Psychrobacter* sp. UDEC-A5, los resultados de actividad metabólica obtenidos mediante la reducción de WST-1, coinciden con los obtenidos mediante citometría de flujo. En ambas temperaturas (10°C y 20°C), y estrés osmótico por NaCl, se observó que la adición de GB permitió el incremento de la actividad metabólica.

En presencia de NaCl y suplementado con GB se detectó un incremento en el tamaño y complejidad celular de una subpoblación bacteriana correspondiente al 43%, la cual presentó mayor actividad metabólica. El aumento del tamaño celular en ambientes de baja actividad de agua y en presencia de osmoprotectores ha sido descrito con anterioridad por Ponder et. al (2004), y Csonka, (1989). Atribuyendo este aumento a la acumulación de osmoprotectores de manera intracelular para mantener el equilibrio en las concentraciones de soluto interno y externo. Por el contrario, en presencia de NaCl, pero a 10°C el tamaño celular relativo y la complejidad celular fue mas homogénea. En esta condición, solo un 13% de la población celular presentó aumento del tamaño celular relativo y de la complejidad intracitoplasmática al disminuir la temperatura, misma población que presentó la mayor porcentaje de IF. Este aumento del tamaño en celular, junto mayor nivel de IF podría ser explicado debido a que esta proporción de la subpoblación logró aclimatarse a la disminución de temperatura, utilizando estrategias como; la modificación en la composición de ácidos grasos de su membrana, o la composición de su LPS o la síntesis de proteínas cold shock (Ponder *et al.*, 2004; 2008; Amato y Christner, 2009; Song *et al.*, 2012). Esta fracción de mayor tamaño celular no se observó en presencia de estrés osmolar, en donde la población celular tiende a ser homogénea. Fenómeno opuesto observó Ponder *et al.* (2004) en *Psychrobacter* sp. cepa 273 y *Arthrobacter* sp. cepa 45, donde al aumentar la osmolaridad del medio se presentó pleomorfismo celular en ambos aislados.

El estrés térmico según el criterio de Hébraud y Potier (1999) ocasionado por una disminución de 10°C, de 30°C a 20°C, no modificó el tamaño ni complejidad

celular de la cepa bacteriana *Deinococcus* sp. UDEC-P1. Sin embargo, el estrés osmótico aumentó el tamaño celular relativo y la complejidad celular, independientemente de la temperatura estudiada. Chou (1991) describe que *Deinococcus radiodurans*, en presencia de concentraciones 0.1M NaCl, realiza divisiones celulares, sin embargo sus células no logran separarse, formando agregados de 8, 16 ó 32 células. Estos antecedentes podrían explicar el aumento del tamaño celular relativo, así como la complejidad citoplasmática. Más aún, el mismo autor indicó que GB no evita este efecto en *D. radiodurans*, coincidiendo con los resultados encontrados en este estudio en el cual en presencia de GB se mantiene el aumento del tamaño y de la complejidad citoplasmática de *Deinococcus* sp. UDEC-P1.

La actividad metabólica en presencia de 0.1M NaCl mostró una disminución significativa en comparación al control, con un efecto considerado de tipo bacteriostático para *Deinococcus* sp. UDEC-P1. Estos efectos fueron revertidos, en presencia de GB, independiente de la temperatura ensayada (30°C ó 20°C). Al extrapolar estos resultados a condiciones ambientales, se sugiere que, la presencia de GB en el ambiente, permitiría a las bacterias del género *Deinococcus*, sobrevivir en ambientes con mayor osmolaridad. En efecto, GB ha sido cuantificada en distintos ambientes, como el Mar muerto y cortezas de yeso estratificadas, mostrando ser el osmoprotector de mayor ubicuidad en la naturaleza (Oren et al. 2013; Scholz et al., 2015). Lo cual le permitiría, colonizar nichos ecológicos de mayor concentración osmótica. Por otro lado, en presencia de GB, concentraciones superiores de NaCl (0.25M) pasaron de ser letales, a ser bacteriostáticas. Además, se sugiere que la cepa *Deinococcus* sp. UDEC-P1, no se encontraría en estado metabólico activo en ambientes marinos, sino que estas bacterias en condiciones bacteriostáticas estarían en un estado de dormancia metabólica, inducida por la concentración de NaCl. La dormancia, es la capacidad de un organismo para entrar en un estado de baja actividad metabólica, cuando las condiciones ambientales son desfavorables. Este estado es una condición metabólica reversible, puesto que son

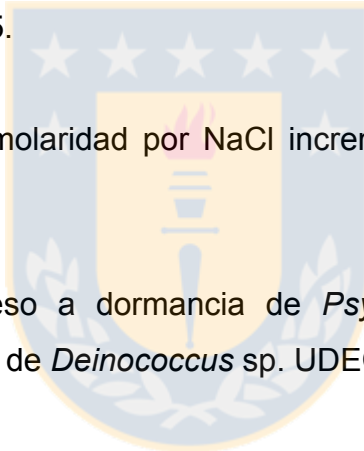
capaces de recuperar su actividad metabólica, cuando ocurre un cambio favorable en su ambiente (Lennon y Jones, 2011). En efecto, Im et al., (2013) describe en *Deinococcus radiodurans* R1 cultivada a 0.3M de NaCl disminuye la expresión de genes relacionados al metabolismo de aminoácidos y carbohidratos, al igual que genes involucrados en rutas metabólicas de crecimiento celular, como glicolisis, y síntesis de ATP, proteínas y peptidoglican. La disminución en la expresión de estos genes metabólicos podría estar vinculada con la entrada en el estado de dormancia metabólica. Guerra et al., (2015), cuantificó la proporción de células con actividad metabólica mediante citometría de flujo utilizando RedoxSensor Green (RSG) y, Yoduro de propidio para evaluar la integridad de membrana. De tal manera, que aquellas células que no presentaron algún tipo de tinción, fueron consideradas como células dormantes. Utilizando este criterio, se determinó que la presencia de NaCl 0.1M aumentó en *Deinococcus* sp. UDEC-P1 el porcentaje de la población dormante en 40% (7 veces) en comparación al control. Sin embargo, la presencia de GB no modificó este porcentaje de dormantes. Esto indica que, GB mantiene el metabolismo y por tanto, la proporción de células activas, disminuyendo el porcentaje de células bacterianas con membrana dañada. Esto se puede explicar, según lo propuesto por Jones y Lennon (2010) que sugieren que, células dormantes o activas de manera independiente, pueden ser llevadas a muerte celular debido a un estrés, como ocurriría en presencia de NaCl. En *Psychrobacter* sp. UDEC-A5, ocurrió un fenómeno diferente, ya que el porcentaje de células dormantes se incrementó en presencia de NaCl (10%), en comparación al control. Sin embargo, el porcentaje de dormantes no presentó diferencias significativas cuando se adicionó GB al medio, manteniendo el mismo valor que el control (1%). En base a lo propuesto por Jones y Lennon (2010), se sugiere que, GB contribuiría a mantener la actividad metabólica, disminuyendo el número de células con muerte celular, y al mismo tiempo, disminuiría la entrada a dormancia de una fracción de la población en presencia de NaCl, enmascarando un efecto deletéreo en el ambiente, y por tanto disminuyendo el “reservorio de semillas”, cuando el entorno cambie a condiciones menos favorables.

Los resultados en su conjunto demuestran que la presencia de NaCl fue capaz de inhibir la actividad metabólica de *Deinococcus* sp. UDEC-P1 y *Psychrobacter* sp. UDEC-A5, la que fue revertida por la presencia de Glicina-GB. La presencia de mayores niveles de osmolaridad, aumentó la proporción de células metabólicamente dormantes. Sin embargo, ambas cepas responden diferente en cuanto GB es adicionada al medio en presencia de NaCl. Glicina-betaina en *Deinococcus* sp. UDEC-P1, estimuló el metabolismo, sin modificar el porcentaje de células dormantes, y por el contrario *Psychrobacter* sp. UDEC-A5, GB disminuyó la proporción de células dormantes.



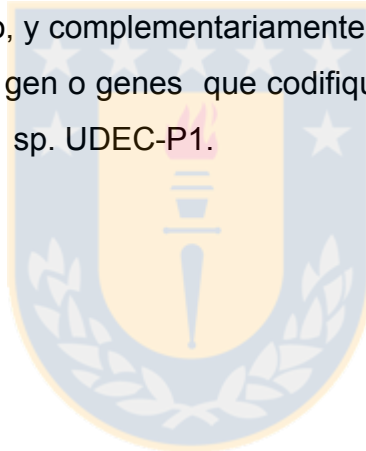
7. CONCLUSIONES

- 1.- *Deinococcus* sp. UDEC-P1 es más susceptible que *Psychrobacter* sp. UDEC-A5 al estrés osmótico ocasionado por NaCl.
- 2.- Tanto en *Deinococcus* sp. UDEC-P1, como en *Psychrobacter* sp. UDEC-A5 GB mantienen la actividad metabólica frente a un aumento de osmolaridad y disminución de la temperatura.
- 3.- Aumentos en la concentración de GB extracelular, no aseguran un efecto protector sobre la actividad metabólica bacteriana en *Deinococcus* sp. UDEC-P1 y *Psychrobacter* sp. UDEC-A5.
- 4.- El incremento de la osmolaridad por NaCl incrementa la proporción de células dormantes en ambas cepas.
- 5.- GB disminuye el ingreso a dormancia de *Psychrobacter* sp. UDEC-A5, en presencia de NaCl, pero no de *Deinococcus* sp. UDEC-P1.



8. PROYECCIONES

Existen variedad de estudios indicando como GB protege a las células bacterianas del estrés osmótico. Sin embargo, no se han realizado estudios que relacionen el accionar de GB sobre las células dormantes. Es por esto, que se requiere continuar investigando como se vincula GB con la disminución en la proporción de células dormantes en presencia de estrés osmolar. Se sugieren estudios que involucren *cell-sorting* de la población de bacterias dormantes, de manera de determinar si en un ambiente sin NaCl y sin GB se modifica su actividad metabólica. Por otro lado, estudios de sobrevivencia en *Deinococcus* sp. UDEC-P1, frente a estrés oxidativo (UV, etanol), con células expuestas previamente a NaCl en comparación a células sin exposición a NaCl previo, y complementariamente un análisis bioinformático para determinar la secuencia del gen o genes que codifiquen para los transportadores de GB en la cepa *Deinococcus* sp. UDEC-P1.



9. REFERENCIAS

1. Aldridge, B. B., & Rhee, K. Y. (2014). Microbial metabolomics: innovation, application, insight. *Current opinion in microbiology*, **19**, 90-96.
2. Anderson, K. L., Roberts, C., Disz, T., Vonstein, V., Hwang, K., Overbeek, R., & Dunman, P. M. (2006). Characterization of the *Staphylococcus aureus* heat shock, cold shock, stringent, and SOS responses and their effects on log-phase mRNA turnover. *Journal of bacteriology*, **188**(19), 6739-6756.
3. Allison, K. R., Brynildsen, M. P., & Collins, J. J. (2011). Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature*, **473**(7346), 216-220.
4. Alvarez-Ordóñez, A., Broussolle, V., Colin, P., Nguyen-The, C., & Prieto, M. (2015). The adaptive response of bacterial food-borne pathogens in the environment, host and food: Implications for food safety. *International journal of food microbiology*, **213**, 99-109.
5. Amato, P., & Christner, B. C. (2009). Energy metabolism response to low-temperature and frozen conditions in *Psychrobacter cryohalolentis*. *Applied and environmental microbiology*, **75**(3), 711-718.
6. Aranda, C., Godoy, F., Becerra, J., Barra, R., & Martínez, M. (2003). Aerobic secondary utilization of a non-growth and inhibitory substrate 2, 4, 6-trichlorophenol by *Sphingopyxis chilensis* S37 and Sphingopyxis-like strain S32. *Biodegradation*, **14**(4), 265-274.

7. Bakermans, C., Bergholz, P. W., Rodrigues, D. F., Vishnivetskaya, T. A., Ayala-del-Río, H. L., & Tiedje, J. M. (2012). Genomic and expression analyses of cold-adapted microorganisms. *Polar microbiology: life in a deep freeze*, 126-155.
8. Bakermans, C., & Nealson, K. H. (2004). Relationship of critical temperature to macromolecular synthesis and growth yield in *Psychrobacter cryopegella*. *Journal of bacteriology*, **186**(8), 2340-2345.
9. Bakermans, C., Tsapin, A. I., Souza-Egipsy, V., Gilichinsky, D. A., & Nealson, K. H. (2003). Reproduction and metabolism at -10 C of bacteria isolated from Siberian permafrost. *Environmental microbiology*, **5**(4), 321-326.
10. Berg, J., Hung, Y. P., & Yellen, G. (2009). A genetically encoded fluorescent reporter of ATP: ADP ratio. *Nature methods*, **6**(2), 161-166.
11. Bergmann, S., David, F., Clark, W., Wittmann, C., & Krull, R. (2013). Membrane fluidity of halophilic ectoine-secreting bacteria related to osmotic and thermal treatment. *Bioprocess and biosystems engineering*, **36**(12), 1829-1841.
12. Bergholz, P. W., Bakermans, C., & Tiedje, J. M. (2009). *Psychrobacter arcticus* 273-4 uses resource efficiency and molecular motion adaptations for subzero temperature growth. *Journal of bacteriology*, **191**(7), 2340-2352.
13. Breaker, R. R. (2010). RNA switches out in the cold. *Molecular cell*, **37**(1), 1-2.
14. Beumer, R. R., Te Giffel, M. C., Cox, L. J., Rombouts, F. M., & Abee, T. (1994). Effect of exogenous proline, betaine, and carnitine on growth of *Listeria monocytogenes* in a minimal medium. *Applied and environmental microbiology*, **60**(4), 1359-1363.

15. Bowler, L. L., Ball, T. B., & Seward, L. L. (2014). A novel in vitro co-culture system allows the concurrent analysis of mature biofilm and planktonic bacteria with human lung epithelia. *Journal of microbiological methods*, **101**, 49-55.
16. Cayley, S., Lewis, B. A., & Record, M. T. (1992). Origins of the osmoprotective properties of betaine and proline in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, **174**(5), 1586-1595.
17. Chen, C., & Beattie, G. A. (2008). *Pseudomonas syringae* BetT is a low-affinity choline transporter that is responsible for superior osmoprotection by choline over glycine betaine. *Journal of bacteriology*, **190**(8), 2717-2725.
18. Chou, F. I., & Tan, S. T. (1991). Salt-mediated multicell formation in *Deinococcus radiodurans*. *Journal of bacteriology*, **173**(10), 3184-3190.
19. Csonka, L. N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological reviews*, **53**(1), 121-147.
20. Darcan, C., Ozkanca, R., Idil, O., & Flint, K. P. (2008). Viable but non-culturable state (VBNC) of *Escherichia coli* related to EnvZ under the effect of pH, starvation and osmotic stress in sea water. *Polish journal of microbiology*, **58**(4), 307-317.
21. Deaton, L. E. (2001). Hyperosmotic volume regulation in the gills of the ribbed mussel, *Geukensia demissa*: rapid accumulation of betaine and alanine. *Journal of experimental marine biology and ecology*, **260**(2), 185-197.
22. Dworkin, J., & Shah, I. M. (2010). Exit from dormancy in microbial organisms. *Nature reviews microbiology*, **8**(12), 890-896.

23. Etemadifar, Z., Gholami, M., & Derikvand, P. (2015). UV-resistant bacteria with multiple-stress tolerance isolated from desert areas in Iran. *Geomicrobiology journal*, (just-accepted), 00-00.
24. Fedorow C. A., Churchill T. A., Kneteman N. M. (1998) Effects of hypothermic hypoxia on anaerobic energy metabolism in isolated anuran livers. *Journal of comparative physiology B* 168:555–561.
25. Guerra, M., Pavez, P., Gonzalez, C., Martinez, M. (2013). Inducción de la dormancia metabólica por condiciones de inanición de carbono y temperatura en un Bacilo Gram Negativo aislado desde la Patagonia. Presentación tipo poster. XXXV Congreso Chileno de Microbiología, Maitencillo, Chile.
26. Hébraud, M., & Potier, P. (1999). Cold shock response and low temperature adaptation in psychrotrophic bacteria. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, **1**(2), 211-219.
27. Hoffmann, T., Wensing, A., Brosius, M., Steil, L., Völker, U., & Bremer, E. (2013). Osmotic control of opuA expression in *Bacillus subtilis* and its modulation in response to intracellular glycine betaine and proline pools. *Journal of bacteriology*, **195**(3), 510-522.
28. Im, S., Joe, M., Kim, D., Park, D. H., & Lim, S. (2013). Transcriptome analysis of salt-stressed *Deinococcus radiodurans* and characterization of salt-sensitive mutants. *Research in microbiology*, **164**(9), 923-932.
29. Imhoff, J. F. (1986). Osmoregulation and compatible solutes in eubacteria. *FEMS microbiology letters*, **39**(1), 57-66.

30. Iscla, I., & Blount, P. (2012). Sensing and responding to membrane tension: the bacterial MscL channel as a model system. *Biophysical journal*, **103**(2), 169-174.
31. Johnsen, A. R., Bendixen, K., & Karlson, U. (2002). Detection of microbial growth on polycyclic aromatic hydrocarbons in microtiter plates by using the respiration indicator WST-1. *Applied and environmental microbiology*, **68**(6), 2683-2689.
32. Junge, K., Eicken, H., & Deming, J. W. (2004). Bacterial activity at -2 to -20 C in Arctic wintertime sea ice. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**(1), 550-557.
33. Kandror, O., DeLeon, A., & Goldberg, A. L. (2002). Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proceedings of the national academy of sciences*, **99**(15), 9727-9732.
34. Keep, N. H., Ward, J. M., Cohen-Gonsaud, M., & Henderson, B. (2006). Wake up! Peptidoglycan lysis and bacterial non-growth states. *Trends in microbiology*, **14**(6), 271-276.
35. Kortmann, J., & Narberhaus, F. (2012). Bacterial RNA thermometers: molecular zippers and switches. *Nature reviews microbiology*, **10**(4), 255-265.
36. Lennon, J. T., & Jones, S. E. (2011). Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. *Nature reviews microbiology*, **9**(2), 119-130.
37. Lewis, K. (2010). Persister cells. *Annual review of microbiology*, **64**, 357-372.
38. Mardones A. 2013. Participación de enzimas antioxidantes en protección frente a estrés oxidativo generado por radiación ultravioleta en bacterias aisladas desde la

Patagonia y Antártica chilena. Tesis Magíster en Ciencias. Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Biológicas. Dirección de Postgrado.

39. Martins, L. O., Soares, C. M., Pereira, M. M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G. H., & Henriques, A. O. (2002). Molecular and Biochemical Characterization of a Highly Stable Bacterial Laccase That Occurs as a Structural Component of the *Bacillus subtilis* Endospore Coat. *Journal of biological chemistry*, **277**(21), 18849-18859.
40. Minton, K. W. (1994). DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Molecular microbiology*, **13**(1), 9-15
41. Monsalves M. 2015. Efecto de la disponibilidad de manganeso en la protección del ADN de *Deinococcus sp.* UDEC-P1 expuesto a radiación UV. Tesis para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Marina y Acuícola. Universidad de Concepción. Facultad de Cs. Naturales y Oceanográficas.
42. Morita, R. Y., & Morita, R. Y. (1997). *Bacteria in oligotrophic environments: starvation-survival lifestyle* (Vol. 1). New York: Chapman & Hall.
43. Mykytczuk, N. C., Foote, S. J., Omelon, C. R., Southam, G., Greer, C. W., & Whyte, L. G. (2013). Bacterial growth at -15 C; molecular insights from the permafrost bacterium *Planococcus halocryophilus* Or1. *The ISME journal*, **7**(6), 1211-1226.
44. Napolitano, M. J., & Shain, D. H. (2004). Four kingdoms on glacier ice: convergent energetic processes boost energy levels as temperatures fall. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **271**(Suppl 5), S273-S276.
45. Napolitano, M. J., & Shain, D. H. (2005). Distinctions in adenylate metabolism among organisms inhabiting temperature extremes. *Extremophiles*, **9**(2), 93-98.

46. Oliver, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of microbiology*, **43**(1), 93-100.
47. Oliver, J. D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS microbiology reviews*, **34**(4), 415-425.
48. Oren, A., Bardavid, R. E., Kandel, N., Aizenshtat, Z., & Jehlička, J. (2013). Glycine betaine is the main organic osmotic solute in a stratified microbial community in a hypersaline evaporitic gypsum crust. *Extremophiles*, **17**(3), 445-451.
49. Orman, M. A., & Brynildsen, M. P. (2013). Dormancy is not necessary or sufficient for bacterial persistence. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **57**(7), 3230-3239.
50. Parry, B. R., Surovtsev, I. V., Cabeen, M. T., O'Hern, C. S., Dufresne, E. R., & Jacobs-Wagner, C. (2014). The bacterial cytoplasm has glass-like properties and is fluidized by metabolic activity. *Cell*, **156**(1), 183-194.
51. Price, P. B., & Sowers, T. (2004). Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**(13), 4631-4636.
52. Ponder, M. A., Gilmour, S. J., Bergholz, P. W., Mindock, C. A., Hollingsworth, R., Thomashow, M. F., & Tiedje, J. M. (2005). Characterization of potential stress responses in ancient Siberian permafrost psychroactive bacteria. *FEMS microbiology ecology*, **53**(1), 103-115.

53. Ponder, M. A., Thomashow, M. F., & Tiedje, J. M. (2008). Metabolic activity of Siberian permafrost isolates, *Psychrobacter arcticus* and *Exiguobacterium sibiricum*, at low water activities. *Extremophiles*, **12**(4), 481-490.
54. Pumirat, P., Saetun, P., Sinchaikul, S., Chen, S. T., Korbsrisate, S., & Thongboonkerd, V. (2009). Altered secretome of *Burkholderia pseudomallei* induced by salt stress. *Biochimica et biophysica Acta (BBA)-Proteins and proteomics*, **1794**(6), 898-904.
55. Rand RP (2004) "Osmotic Stress Pressure Measurements." Retrieved 11-6-07, 2007, from http://www.brocku.ca/researchers/peter_rand/osmotic/osfile.html.
56. Rhee, K. Y., de Carvalho, L. P. S., Bryk, R., Ehrt, S., Marrero, J., Park, S. W., ... & Nathan, C. (2011). Central carbon metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*: an unexpected frontier. *Trends in microbiology*, **19**(7), 307-314.
57. Rubiano-Labrador, C., Bland, C., Miotello, G., Armengaud, J., & Baena, S. (2015). Salt Stress Induced Changes in the Exoproteome of the Halotolerant Bacterium *Tistlia consotensis* Deciphered by Proteogenomics. *PloS one*, **10**(8), e0135065.
58. Scholz, A., Stahl, J., Berardinis, V., Müller, V., & Averhoff, B. (2015). Osmotic stress response in *Acinetobacter baylyi*: Identification of a glycine–betaine biosynthesis pathway and regulation of osmoadaptive choline uptake and glycine betaine synthesis through a choline–responsive BetI repressor. *Environmental microbiology*.
59. Shivaji, S., & Prakash, J. S. (2010). How do bacteria sense and respond to low temperature?. *Archives of microbiology*, **192**(2), 85-95.

60. Shukla, M., Chaturvedi, R., Tamhane, D., Vyas, P., Archana, G., Apte, S., ... & Desai, A. (2007). Multiple-stress tolerance of ionizing radiation-resistant bacterial isolates obtained from various habitats: correlation between stresses. *Current microbiology*, **54**(2), 142-148.
61. Skjerdal, O. T., Sletta, H., Flenstad, S. G., Josefsen, K. D., Levine, D. W., & Ellingsen, T. E. (1996). Changes in intracellular composition in response to hyperosmotic stress of NaCl, sucrose or glutamic acid in *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*. *Applied microbiology and biotechnology*, **44**(5), 635-642.
62. Sleator, R. D., & Hill, C. (2002). Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS microbiology reviews*, **26**(1), 49-71.
63. Soina, V. S., Lysak, L. V., Konova, I. A., Lapygina, E. V., & Zvyagintsev, D. G. (2012). Study of ultramicrobacteria (nanoforms) in soils and subsoil deposits by electron microscopy. *Eurasian soil science*, **45**(11), 1048-1056.
64. Song, W., Lin, X., & Huang, X. (2012). Characterization and expression analysis of three cold shock protein (CSP) genes under different stress conditions in the Antarctic bacterium *Psychrobacter* sp. G. *Polar biology*, **35**(10), 1515-1524.
65. Steven, B., L veill , R., Pollard, W. H., & Whyte, L. G. (2006). Microbial ecology and biodiversity in permafrost. *Extremophiles*, **10**(4), 259-267.
66. Vaknin, A., & Berg, H. C. (2006). Osmotic stress mechanically perturbs chemoreceptors in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**(3), 592-596.

67. Wettlaufer, J. S. (1999). Crystal growth, surface phase transitions and thermomolecular pressure. In *Ice Physics and the Natural Environment* (pp. 39-67). Springer Berlin Heidelberg.
68. Wood, J. M. (1999). Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiology and molecular biology reviews*, **63**(1), 230-262.
69. Wood, J. M. (2011). Bacterial osmoregulation: a paradigm for the study of cellular homeostasis. *Annual review of microbiology*, **65**, 215-238.
70. Yao, X., Walter, J., Burke, S., Stewart, S., Jericho, M. H., Pink, D., & Beveridge, T. J. (2002). Atomic force microscopy and theoretical considerations of surface properties and turgor pressures of bacteria. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **23**(2), 213-230.
71. Young, J. W., Locke, J. C., & Elowitz, M. B. (2013). Rate of environmental change determines stress response specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**(10), 4140-4145.
72. Youssef, N. H., Savage-Ashlock, K. N., McCully, A. L., Luedtke, B., Shaw, E. I., Hoff, W. D., & Elshahed, M. S. (2014). Trehalose/2-sulfotrehalose biosynthesis and glycine-betaine uptake are widely spread mechanisms for osmoadaptation in the Halobacteriales. *The ISME journal*, **8**(3), 636-649.