

Estrategias bacterianas para contrarrestar el estrés causado por frío y/o por congelación-descongelación y panorama de tolerancia de las rizobacterias.

Oswaldo Rodríguez-Andrade¹, Patricia Bernal², Rebeca Débora Martínez-Contreras¹, Yolanda Elizabeth Morales-García^{1,3}, Dalia Molina-Romero^{1,3}, Vianey Marín-Cevada¹, América Paulina Rivera-Urbalejo¹, Jesús Muñoz-Rojas^{1*}.

¹Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), Puebla, México. Edificio 103 J, Ciudad Universitaria, San Manuel, Puebla, México. C. P. 72570. Correo electrónico:

joymerre@yahoo.com.mx

²Imperial College London, MRC Centre for Molecular Bacteriology and Infection, Department of Life Sciences, South Kensington Campus, London, United Kingdom.

³Facultad de Ciencias Biológicas de la BUAP.

Muñoz-Rojas J, et al. Estrategias bacterianas para contrarrestar el estrés causado por frío y/o por congelación-descongelación y panorama de tolerancia de las rizobacterias. Alianzas y Tendencias-BUAP. 2018, 3 (10): 1-13.

Recibido: 10 abril 2018.

Aceptado: 15 mayo 2018.



Resumen.

Las bacterias continuamente se enfrentan a condiciones adversas en el medio ambiente, que representan un factor de estrés y que restringen su supervivencia. Entre esos factores se encuentran: la limitación de agua, las fluctuaciones en la temperatura, los valores extremos de pH, elevadas concentraciones de sales, la exposición a radiación ultravioleta, etc. La presente revisión se centra en examinar las estrategias utilizadas por bacterias pertenecientes a diferentes géneros para enfrentar el estrés causado por bajas temperaturas y por ciclos repetidos de congelación-descongelación; condiciones que ocurren con frecuencia en algunos ambientes. Los estudios de tolerancia bacteriana a congelación-descongelación aún son escasos, pero podrían ser de gran relevancia para el incremento de la supervivencia de bacterias promotoras del crecimiento de plantas bajo condiciones extremas de frío.

Palabras Clave: Bacterias, congelación-descongelación, estrés por frío, cristales de hielo, crioprotectores.

Introducción.

El estrés por congelación-descongelación produce diferentes efectos sobre la célula. Por ejemplo, la fluidez de la membrana se altera y se detienen los procesos de transporte a través de ésta (1). Bajo condiciones de estrés por frío se produce la inactivación de enzimas y transportadores asociados a la membrana (2), así como también ocurre una disminución en la fluidez de la membrana y la

filtración de compuestos en tales condiciones (3). El daño en la membrana es considerado uno de los efectos más serios causados por frío, debido a que ésta es la primera barrera que separa y a la vez comunica a la célula con su ambiente (2).

Otro efecto que se puede presentar en la célula durante la congelación está relacionado con un aumento en la viscosidad del citoplasma debido al incremento de la concentración de sales, lo que altera el intercambio metabólico (1). Además, se ha reportado que cuando una célula es expuesta a disminuciones abruptas de la temperatura, se puede presentar una desestabilización en las estructuras secundarias del ADN y el ARN (2) y se pueden debilitar los enlaces hidrofóbicos existentes en las proteínas. La disminución repentina de la temperatura también provoca la inactivación de enzimas alostéricas y ribosomas (1).

En condiciones de baja temperatura, las bacterias pueden tener un crecimiento aletargado y algunas estructuras celulares pueden estar alteradas (3). Durante la congelación se produce una reducción significativa en la actividad metabólica de las bacterias, hasta que ésta se hace casi imperceptible, aunque suficiente para mantener vivo al microorganismo (1). Esto puede conducir a la muerte celular, o a un estado de inanición del metabolismo también denominado estado viable no cultivable, donde la expresión génica es virtualmente no detectable (3). Cuando la velocidad de enfriamiento es elevada se forman cristales de hielo en el exterior celular (1), disminuye la actividad de agua, se concentran algunos solutos y

consecuentemente ocurre la deshidratación celular, produciéndose daños en la membrana y la desnaturalización de proteínas (4).

Los eventos de congelación-descongelación también pueden afectar tanto a la estructura como a la función de las poblaciones microbianas en el suelo (5). Aparentemente, la viabilidad de las bacterias en el suelo no es disminuida por el estado de inanición inducido por el frío, sino por el proceso de congelación-descongelación (4). Además, en las comunidades microbianas ocurre una disminución de la respiración microbiana y del contenido de ADN debido a los eventos de congelación-descongelación (6).

Factores generales que influyen en la supervivencia bacteriana a la congelación-descongelación.

La supervivencia que una bacteria muestra bajo estrés por congelación-descongelación depende de varios factores bióticos y abióticos (Fig. 1). Por ejemplo, la pérdida de viabilidad es proporcional al número de ciclos de congelación-descongelación que las células experimentan y el tiempo que las células permanecen congeladas generalmente tiene una menor influencia (7). La fase de crecimiento de un microorganismo también influye en la supervivencia, observando que ésta es mayor en fase estacionaria con respecto a la fase exponencial de crecimiento. Por ejemplo, *Listeria monocytogenes* F2365 es más sensible en la fase de crecimiento exponencial a los eventos sucesivos de congelación-descongelación (8). Esta mayor

sensibilidad en fase exponencial también ha sido observada para otras bacterias cuando son sometidas a liofilización, donde las bacterias son congeladas antes de someterlas al vacío y pérdida de agua (9,10). Además, se ha demostrado que durante la fase estacionaria se presenta una mayor acumulación de solutos compatibles y proteínas de estrés (11), lo que llevaría a una mayor supervivencia en condiciones de estrés.

La supervivencia de algunas cepas de *L. monocytogenes*, bajo condiciones de estrés por congelación-descongelación, incrementa cuando las células son crecidas en medio de cultivo gelificado con respecto a las células que son crecidas en medio líquido (8). Además, los cultivos sujetos a pasos de centrifugación y resuspensión tuvieron una mayor criotolerancia con respecto a los cultivos que no fueron tratados. Otros factores que tienen influencia sobre la supervivencia de bacterias a la congelación-descongelación son el estado nutricional de las células y la velocidad de enfriamiento empleada (7).

En la preservación de microorganismos mediante congelación hay varios factores que podrían influir en la eficacia de este proceso, como la especie, el tipo de cepa, el tamaño y la forma de la célula, la fase y la tasa de crecimiento, la composición del medio de cultivo para el crecimiento bacteriano, pH, osmolaridad, aeración, contenido de agua celular, contenido y composición de lípidos en la célula, densidad a la que se lleva a cabo la congelación, composición del medio usado para la congelación, velocidad de enfriamiento, temperatura y duración de almacenamiento, así como las condiciones bajo

las que se realiza la descongelación (12). Tales factores deben ser considerados para la preservación efectiva de microorganismos recién aislados y caracterizados, que se desean resguardar (10).

Mecanismos de supervivencia bacteriana en condiciones de estrés por frío y congelación-descongelación.

Para hacer frente a condiciones de estrés por frío y congelación-descongelación las bacterias han desarrollado diferentes estrategias que les permiten sobrevivir en los diferentes ambientes. Entre estas estrategias se encuentran la modificación de estructuras celulares, la producción de compuestos que les permiten protegerse, la producción de moléculas estables a bajas temperaturas y modificaciones en el metabolismo (Fig. 1). Gran parte de estas estrategias implican cambios a nivel de expresión génica.

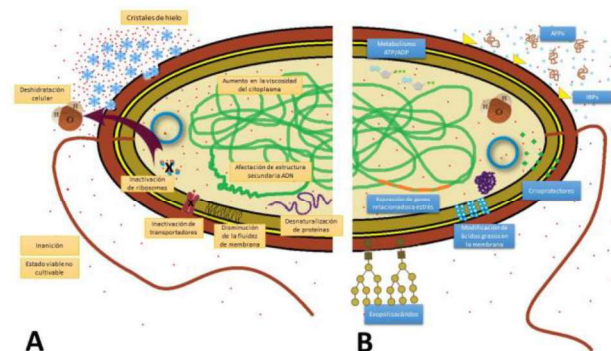


Figura 1. Representación esquemática de los efectos del estrés por frío y congelación-descongelación en bacterias (A) y principales estrategias de supervivencia bacteriana bajo estas condiciones de estrés (B). Abreviaturas: IBPs, proteínas de unión a hielo; AFPs, proteínas anticongelantes.

Envoltura celular.

La envoltura celular es de vital importancia para la supervivencia de las bacterias en condiciones de estrés por frío y congelación debido a que es la estructura que tiene contacto con el ambiente y de ella dependen muchos de los mecanismos de transporte entre el interior y el exterior de la célula (13). Es por ello que las modificaciones y el mantenimiento de la integridad de esta estructura son cruciales para que un microorganismo pueda contener en condiciones adversas en su ambiente. Para el caso de *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* CFL1, las células resistentes a congelación muestran un contenido más alto de ácidos grasos cíclicos e insaturados, con lo cual se presenta una reducción en la temperatura de transición de fase lipídica en la membrana durante la congelación. De esta manera, un valor bajo cero en la fase de transición lipídica permite el mantenimiento de la membrana en un estado relativamente fluido durante la congelación, lo cual facilita el flujo de agua de la célula (14). *Lactobacillus acidophilus* muestra una mayor resistencia a condiciones de congelación y almacenamiento a -20 °C cuando se expone previamente a un estado de inanición de lactosa. Esto es debido a que este estado de inanición produce un incremento en la síntesis de ácidos grasos insaturados, cíclicos y ramificados y consecuentemente una mayor fluidez de la membrana (15).

En *Micobacterium smegmatis* se ha sugerido que la proteína Hlp (histona-like) desempeña una función importante en la resistencia de esta bacteria a condiciones de estrés por congelación-descongelación. La mutación del gen que codifica para esa proteína afecta a la supervivencia bacteriana en condiciones de congelación y de exposición a luz UV, aparentemente por cambios en la composición de la pared celular que perturban la permeabilidad (16).

Crioprotectores.

Los compuestos que protegen a las bacterias en condiciones de congelación-descongelación son denominados crioprotectores, entre los cuales destacan los azúcares, aminoácidos, polialcoholes y los polímeros (17). Los mecanismos de esa protección podrían ser muy variados en función del tipo de molécula, por ejemplo la glicina y algunos disacáridos, aparentemente protegen la integridad de la membrana (12,18), no obstante el myo-inositol y otros polialcoholes tienen una función reguladora en la homeostasis celular por lo que son denominados osmoprotectores (10). La protección de algunos compuestos depende de su internalización al citoplasma, por ejemplo, en la mutante de *L. acidophilus* en el gen *treB* (Sistema trehalosa-fosfotransferasa; que codifica para el sistema de transporte de trehalosa) se ha demostrado un efecto crioprotector reducido de la trehalosa para las células en estrés por congelación (19). La mutación en el gen *treC* (trehalosa-6-fosfato hidrolasa; que interviene en la degradación

intracelular de la trehalosa), también afecta a la protección de este disacárido contra el estrés por congelación (19), lo que refuerza la idea de la importancia de la presencia intracelular de la trehalosa para la protección.

Otros autores sugieren que la participación de compuestos crioprotectores como la trehalosa, el glicerol y el sorbitol favorecen el mantenimiento de algunas actividades enzimáticas (20). Por ejemplo, en *Lactobacillus* se ha observado que la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa se mantiene, cuando se utilizan azúcares como protectores bajo condiciones de liofilización, a pesar de la disminución en el pH que éstos producen (21).

Proteínas de unión a hielo.

Muchos organismos, tales como peces, plantas, hongos, artrópodos y bacterias se protegen de condiciones de congelación mediante la producción de proteínas de unión a hielo (IBPs por sus siglas en inglés), las cuales pueden ser clasificadas en varios tipos: proteínas anticongelantes, proteínas de estructuración de hielo, proteínas de histéresis térmica y proteínas de inhibición de la recristalización del hielo. Estas proteínas tienen la capacidad de unirse a la superficie de los cristales de hielo y evitan que las moléculas de agua se unan para formar estructuras ordenadas. De esta manera, el hielo que crece sobre la superficie del cristal entre las IBPs, producirá una alta curvatura que disminuye la temperatura en la que los cristales de hielo crecen (22).

A partir de bacterias aisladas en la Antártida (a una profundidad de 3519 metros) se ha detectado la presencia de IBPs, las cuales son capaces de influir sobre la estructura física del hielo, inhibiendo la recristalización (23). Se ha encontrado que, en estas bacterias, la expresión de los genes implicados en la producción de tales proteínas es constitutiva. Las proteínas extracelulares de estos aislados mejoraron considerablemente la supervivencia de *Escherichia coli* sometida a ciclos de congelación-descongelación, por lo que se propone que estas proteínas desempeñan un papel muy importante en la supervivencia de esos aislados en esas condiciones ambientales (23). Algunas bacterias aisladas en la Antártida tienen la capacidad de producir AFPs (proteínas anticongelantes por sus siglas en inglés). A partir de 866 aislados de lagos de esa zona, se demostró actividad anticongelante en 187, de los cuales, 19 mostraron además inhibición de la recristalización de hielo (24). Se ha propuesto que las proteínas anticongelantes (AFPs) detienen la formación de los cristales de hielo, sin embargo se conoce poco acerca de su función y cinética de unión a los cristales de hielo. Un estudio ha demostrado que las AFPs se unen de manera irreversible a la superficie del hielo, lo cual ha contribuido a entender como estas proteínas actúan en la interface hielo-agua (25). Interesantemente, algunas AFPs aisladas de la bacteria antártica *Marinomonas primoryensis* poseen un dominio adhesina, que se encuentra distribuido uniformemente en la superficie de la célula (26). Este hecho sugiere que las AFPs pueden tener la

función de unir el microorganismo a la superficie del hielo. Se propone que esta interacción célula-hielo es una forma de proteger la bacteria del efecto dañino del hielo o podría funcionar como una respuesta quimiotáctica que la bacteria usa para buscar la superficie de los lagos y así tener un mejor acceso al oxígeno (26).

Las AFPs pueden tener un efecto de crioprotección o criosterilización sobre células de *E. coli*, dependiendo de la concentración de esta proteína que es adicionada y de las condiciones usadas para la congelación. Las AFPs tienen un efecto de criosterilización a una concentración de 100 µg/ml cuando la suspensión bacteriana es congelada y descongelada a presión atmosférica; sin embargo, cuando se utiliza una concentración de 10 µg/ml y condiciones de congelación-descongelación a baja presión se observa un efecto crioprotector (27).

Se ha propuesto que cierto tipo de proteínas denominadas Proteínas de Nucleación del Hielo (INPs por sus siglas en inglés), pueden favorecer que el agua se congele a temperaturas por debajo de 0 °C (temperatura normal de congelación). *Pseudomonas borealis* produce una INP que posee plegamientos para formar dímeros (β -hélice). Esta dimerización contribuye a incrementar el área de superficie activa de estas proteínas y de esta forma los sitios de nucleación de hielo se extienden como un continuo a través de todo el dímero (28). Por otro lado se ha observado que ciertas comunidades bacterianas encontradas sobre las hojas de plantas expuestas a condiciones invernales son resistentes a bajas temperaturas y ciclos repetitivos de

congelación-descongelación, interesantemente algunas de esas bacterias poseen actividad de nucleación e inhibición de recristalización de hielo (29).

Polisacáridos.

La producción de polisacáridos es importante para potenciar la tolerancia de bacterias a condiciones ambientales adversas que generan estrés. Se ha reportado que una cepa aislada a partir del hielo del mar Antártico, denominada *Pseudoalteromonas sp.* SM20310, produce un polisacárido con una composición química compleja, que posee un efecto protector ante ciclos repetidos de congelación-descongelación y altas concentraciones de salinidad (30). Además, cuando este exopolisacárido es adicionado de manera exógena a *E. coli*, la supervivencia de esta bacteria se incrementa bajo condiciones de congelación-descongelación.

Pseudoalteromonas arctica KOPRI 21653, una cepa aislada a partir de sedimentos de la Antártida también produce un exopolisacárido con capacidad de crioprotección, cuyos componentes principales son galactosa y glucosa. Este exopolisacárido incrementó notablemente la supervivencia de *E. coli* sometida a varios ciclos de congelación-descongelación y se ha propuesto que podría desempeñar una función muy importante en la protección de otros microorganismos que viven en condiciones extremas (31).

En varios casos la producción de exopolisacáridos va ligada a la formación de biofilm (32). Por ejemplo, *Erwinia billingiae* J10 y *Sphingobacterium*

kitahiroshimense Y2 que fueron aisladas de la superficie de las hojas de plantas expuestas a bajas temperaturas producen exopolisacáridos y biofilms, bajo estas condiciones (29).

Metabolismo.

Algunos estudios han mostrado que en el proceso de adaptación de la célula bacteriana a condiciones de estrés por frío o congelación, se presentan cambios en el metabolismo energético (33). Por ejemplo, en *Psychrobacter cryohalolentis* K5 se ha observado un aumento en las concentraciones de ADP y ATP cuando disminuye la temperatura; lo cual puede representar un mecanismo de compensación bioquímica que contribuye a la supervivencia bajo estas condiciones de estrés (34). *Psychrobacter arcticus* 273-4 es capaz crecer a -10 °C usando un metabolismo lento en lugar de un estado de dormancia celular; lo cual le permite sobrevivir en ambientes congelados (35).

Los microorganismos del suelo de un bosque boreal mantienen tanto la producción de CO₂ (catabolismo) como la síntesis de biomasa (anabolismo) bajo condiciones de congelación (36). La utilización de sustratos fue adecuada en estas condiciones, sin embargo, se observó una mayor fluidez en la membrana y un incremento en la producción de glicerol.

Algunas estrategias usadas por *P. arcticus* 273-4 para sobrevivir en condiciones de estrés por frío son la síntesis de proteínas especializadas contra el estrés y el uso de acetato como fuente de energía. En una porción significativa del proteoma de esta

bacteria hay un uso reducido de aminoácidos como la prolina y la arginina, lo que conduce a un aumento en la flexibilidad de las proteínas a bajas temperaturas; este uso diferencial de aminoácidos es más común en genes esenciales para el crecimiento y la reproducción de esta bacteria. Estos factores permiten la adaptación de esta bacteria a las bajas temperaturas en suelo del permafrost en la zona de Siberia (37).

Expresión de genes ligados al metabolismo energético.

En cultivos de *L. monocitogenes* sometidos a estrés por congelación (-20 °C) se presentan elevados niveles de expresión de la proteína Flp (ferritin-like), esta proteína tiene una función en la regulación de varios procesos microbiológicos y se sugiere que la regulación de la síntesis de esta proteína puede ocurrir a nivel transcripcional, ya que se observa un incremento considerable en la cantidad de ARNm *flp* bajo condiciones de estrés por congelación (38). Por otro lado, para *P. arcticus* 273-4 se ha observado una disminución en la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético y la incorporación de fuentes de carbono, así como, un aumento en la expresión de genes relacionados con el mantenimiento de la membrana, la pared celular, la síntesis de ácidos nucleicos y el movimiento (35). Bajo condiciones de temperatura de -6 °C, esta bacteria no aumenta la expresión de chaperonas de ARN o proteínas, sin embargo, se presenta un aumento en la expresión de una helicasa de ARN, denominada CsdA, por lo que se propone que esta

proteína de shock por frío es muy importante para la criotolerancia (35).

En condiciones de inanición de lactosa, *L. acidophilus* responde con un aumento en la expresión de proteínas involucradas en el metabolismo de carbohidratos y metabolismo energético, así como homeostasis de pH. Esto permite que las células estén más preparadas para resistir a los estreses adicionales que se presentan durante el estrés por frío (15).

En algunos análisis metagenómicos de comunidades microbianas de zonas polares, se ha detectado la presencia de genes que codifican proteínas que responden a esas condiciones de estrés ambiental, tales como enzimas para la síntesis de exopolisacáridos, proteínas de shock por frío o enzimas que permiten modificaciones de membrana (39). La presencia de estos genes sugiere una selección ambiental activa que permite su expresión abundante y adaptación de las células bacterianas a la congelación.

Supervivencia de bacterias rizosféricas bajo condiciones de congelación.

Las bacterias rizosféricas son aquellas que se desarrollan en la rizósfera de las plantas y muchas de ellas tienen propiedades benéficas (17,40); entre las que destacan la promoción de crecimiento vegetal y la biorremediación de suelos contaminados. El efecto de la congelación-descongelación sobre bacterias aisladas de rizósfera también se ha analizado en algunos trabajos. Por ejemplo, *Pseudomonas paucimobilis*, una bacteria

aislada de la rizósfera de *Bouteloua gracilis* H.B.K., tolera sin problema una temperatura de -9 °C en cualquier etapa de crecimiento. Sin embargo un solo ciclo severo de congelación-descongelación (-27 °C a 23 °C) provoca una mortalidad del 40-60% para esta bacteria (41).

La rizobacteria *Pseudomonas putida* GR12-2 promotora del crecimiento vegetal se aisló originalmente de la rizósfera de plantas que crecen en el Alto Ártico Canadiense. Esta bacteria fue capaz de crecer y promover la elongación de la raíz de canola tanto en primavera como de invierno a 5 °C, una temperatura a la que solo un número relativamente pequeño de bacterias pueden proliferar y funcionar (42). Además, la bacteria sobrevivió a la exposición a temperaturas de congelación (-20 y -50 °C). En un esfuerzo por determinar la base mecánica de este comportamiento, se descubrió que tras el crecimiento a 5 °C, *P. putida* GR12-2 sintetizó y secretó al medio de crecimiento algunas proteínas con actividad anticongelante.

Aunque se han realizado varios estudios para conocer como los microorganismos de regiones polares sobreviven a temperaturas bajo cero, las comunidades microbianas de suelos que pasan el invierno en áreas expuestas a heladas y frío causado por vientos de deshielos han sido poco estudiados y más aun lo que ocurre en zonas agrícolas. No obstante, con el uso de un criociclador, que permite someter a los suelos a ciclos alternados de congelación-descongelación de forma automática, se ha observado que algunas bacterias como

Pseudomonas chlororaphis, disminuyen su viabilidad después de 48 ciclos de congelación-descongelación (4). El criociclador permite seleccionar bacterias con una tolerancia a congelación-descongelación de más de mil veces lo que soporta en el consorcio original presente en el suelo. Por ejemplo, *Chryseobacterium sp.* C14 inhibe la recristalización del hielo, una propiedad característica de las proteínas anticongelantes que impide el crecimiento de cristales de hielo grandes y potencialmente dañinos a temperaturas cercanas a la temperatura de fusión (43). El desarrollo del criociclador permitirá investigaciones futuras sobre las adaptaciones bioquímicas y de la comunidad del suelo a los rigores del medio ambiente por congelación.

Perspectivas.

Las bacterias rizosféricas presentes en plantas que se desarrollan en condiciones extremas de frío son de vital importancia para su buen funcionamiento, ésta es una de las razones por lo que se han iniciado estudios de su diversidad (44). Conocer las funciones que éstas desempeñan durante la interacción bajo esas condiciones es un reto interesante para resolverse a mediano plazo. Adicionalmente el incremento del conocimiento de bacterias promotoras del crecimiento de plantas en condiciones de bajas temperaturas será trascendental para potenciar la producción de plantas bajo estas condiciones (42). Sin embargo, los estudios de tolerancia bacteriana a congelación-descongelación aún son escasos. El conocimiento de los factores que intervienen en la supervivencia de

bacterias en condiciones de estrés por frío y congelación-descongelación, así como las estrategias utilizadas por los microorganismos para hacer frente a esas condiciones, nos permite entender la función que tienen ciertas moléculas y como las modificaciones celulares han permitido el establecimiento y el crecimiento exitoso de las bacterias que viven en ambientes extremos. Cabe señalar que la mayoría de los trabajos se han enfocado en la búsqueda de estrategias de resistencia a congelación en bacterias de zonas con temperaturas extremas y poco se conoce acerca de estos mecanismos en bacterias que viven en zonas templadas o cálidas, donde estos mecanismos también podrían estar presentes debido a que en etapas antiguas de la Tierra han estado sometidas a fluctuaciones ambientales (45–47). El entendimiento de estos procesos también podrá contribuir al desarrollo futuro de nuevos métodos de criopreservación bacteriana y a la mejora de la supervivencia de microorganismos benéficos que podrían ser inoculados en semillas de plantas para su desarrollo en zonas expuestas a disminuciones drásticas de temperatura.

Agradecimientos.

América Paulina Rivera-Urbalejo pertenece al programa de Posdoctorados de PRODEP-SEP y Osvaldo Rodríguez-Andrade fue becario CONACYT, por lo que agradecemos a dichas instituciones. También agradecemos al M. C. Yagul Pedraza Pérez por el apoyo para la elaboración de la figura de esta revisión. Agradecemos a VIEP-BUAP por el apoyo de

proyectos relacionados a estudios de la supervivencia de microorganismos.

Conflicto de intereses.

Los autores de este trabajo no tienen conflicto de intereses de ningún tipo.

Bibliografía.

1. Sánchez-Leal LC, Corrales-Ramírez LC. Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso. *Nova*. 2005;3(3):109–13.
2. Zhang J, Du GC, Zhang Y, Liao XY, Wang M, Li Y, et al. Glutathione protects *Lactobacillus sanfranciscensis* against freeze-thawing, freeze-drying, and cold treatment. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(9):2989–96.
3. Trevors JT, Bej AK, Mojib N, van Elsas JD, van Overbeek L. Bacterial gene expression at low temperatures. *Extremophiles*. 2012;16(2):167–76.
4. Walker VK, Palmer GR, Voordouw G. Freeze-thaw tolerance and clues to the winter survival of a soil community. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(3):1784–92.
5. Sharma S, Szele Z, Schilling R, Munch JC, Schloter M. Influence of freeze-thaw stress on the structure and function of microbial communities and denitrifying populations in soil. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(3):2148–54.
6. Sawicka JE, Robador A, Hubert C, Jørgensen BB, Brüchert V. Effects of freeze-thaw cycles on anaerobic microbial processes in an Arctic intertidal mud flat. *ISME J*. 2010;4(4):585–94.

7. Sleight SC, Wigginton NS, Lenski RE. Increased susceptibility to repeated freeze-thaw cycles in *Escherichia coli* following long-term evolution in a benign environment. *BMC Evol Biol*. 2006;6:1–8.
8. Azizoglu RO, Osborne J, Wilson S, Kathariou S. Role of growth temperature in freeze-thaw tolerance of *Listeria* spp. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(16):5315–20.
9. Muñoz-Rojas J, Bernal P, Duque E, Godoy P, Segura A, Ramos JL. Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Jan;72(1):472–7.
10. Morales-García Y-E, Duque E, Rodríguez-Andrade O, de la Torre J, Martínez-Contreras R-D, Pérez R, et al. Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *Bio Tecnol*. 2010;14(2):11–29.
11. Palmfeldt J, Rådström P, Hahn-Hägerdal B. Optimisation of initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of *Pseudomonas chlororaphis*. *Cryobiology*. 2003;47(1):21–9.
12. Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 2003;46(3):205–29.
13. Bernal P, Muñoz-Rojas J, Hurtado A, Ramos JL, Segura A. A *Pseudomonas putida* cardiolipin synthesis mutant exhibits increased sensitivity to drugs related to transport functionality. *Environ Microbiol*. 2007 May;9(5):1135–45.
14. Gautier J, Passot S, Pénicaud C, Guillemin H, Cenard S, Lieben P, et al. A low membrane lipid

phase transition temperature is associated with a high cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* CFL1. *J Dairy Sci.* 2013;96(9):5591–602.

15. Wang Y, Delettre J, Corrieu G, Béal C. Starvation induces physiological changes that act on the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Biotechnol Prog.* 2011;27(2):342–50.

16. Whiteford DC, Klingelhoets JJ, Bambenek MH, Dahl JL. Deletion of the histone-like protein (Hlp) from *Mycobacterium smegmatis* results in increased sensitivity to UV exposure, freezing and isoniazid. *Microbiology.* 2011;157(2):327–35.

17. Vivanco-Calixto R, Molina-Romero D, Y.E. M-G, V. Q-H, A. M-H, A. B-R, et al. Reto agrobiotecnológico: inoculantes bacterianos de segunda generación. *Alianzas y Tendencias.* 2016;1(April):9–19.

18. Cleland D, Krader P, McCree C, Tang J, Emerson D. Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. *J Microbiol Methods.* 2004;58(1):31–8.

19. Duong T, Barrangou R, Russell WM, Klaenhammer TR. Characterization of the *tre* locus and analysis of trehalose cryoprotection in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(2):1218–25.

20. Kawahara H. The structures and functions of ice crystal-controlling proteins from bacteria. *J Biosci Bioeng.* 2002;94(6):492–6.

21. Cui S, Hang F, Liu X, Xu Z, Liu Z, Zhao J, et al. Effect of acids produced from carbohydrate metabolism in cryoprotectants on the viability of freeze-dried *Lactobacillus* and prediction of optimal

initial cell concentration. *J Biosci Bioeng.* 2018; In Press:1–6.

22. Braslavsky I, Drori R. LabVIEW-operated Novel Nanoliter Osmometer for Ice Binding Protein Investigations. *J Vis Exp.* 2013;(72):e4189.

23. Achberger AM, Brox TI, Skidmore ML, Christner BC. Expression and partial characterization of an ice-binding protein from a bacterium isolated at a depth of 3 , 519 m in the Vostok ice core , Antarctica. *Front Microbiol.* 2011;2(December):1–8.

24. Gilbert JA, Hill PJ, Dodd CER, Laybourn-parry J, Gilbert JA. Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria. *Microbiology.* 2004;150:171–80.

25. Celik Y, Graham LA, Mok Y-F, Bar M, Davies PL, Braslavsky I. Superheating of ice crystals in antifreeze protein solutions. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(12):5423–8.

26. Guo S, Garnham CP, Whitney JC, Graham LA, Davies PL. Re-evaluation of a bacterial antifreeze protein as an adhesin with ice-binding activity. *PLoS One.* 2012;7(11):e48805.

27. Kawahara H, Higa S, Tatsukawa H, Obata H. Cryoprotection and cryostrilization effect of type I antifreeze protein on *E.coli* cells. *Biocontrol Sci.* 2009;14(2):49–54.

28. Garnham CP, Campbell RL, Walker VK, Davies PL. Novel dimeric β -helical model of an ice nucleation protein with bridged active sites. *BMC Struct Biol.* 2011;11(September):1–11.

29. Wu Z, Kan FWK, She Y-M, Walker VK. Biofilm, ice recrystallization inhibition and freeze-thaw

protection in an epiphyte community. *Appl Biochem Microbiol.* 2012;48(4):363–70.

30. Liu SB, Chen XL, He HL, Zhang XY, Xie B Bin, Yu Y, et al. Structure and ecological roles of a novel exopolysaccharide from the Arctic sea ice bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain SM20310. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(1):224–30.

31. Kim SJ, Yim H. Cryoprotective properties of exopolysaccharide (P-21653) produced by the Antarctic bacterium, *Pseudoalteromonas arctica* KOPRI 21653. *J Microbiol.* 2007;45(6):510–4.

32. Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules.* 2009;14(7):2535–54.

33. Tribelli P, López N. Reporting key features in cold-adapted bacteria. *Life.* 2018;8(1):8.

34. Amato P, Christner BC. Energy metabolism response to low-temperature and frozen conditions in *Psychrobacter cryohalolentis*. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(3):711–8.

35. Kuhn E. Toward understanding life under subzero conditions: the significance of exploring psychrophilic “cold-shock” proteins. *Astrobiology.* 2012;12(11):1078–86.

36. Drotz SH, Sparrman T, Nilsson MB, Schleucher J, Oquist MG. Both catabolic and anabolic heterotrophic microbial activity proceed in frozen soils. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(49):21046–51.

37. Ayala-Del-Río HL, Chain PS, Grzymalski JJ, Ponder MA, Ivanova N, Bergholz PW, et al. The genome sequence of *Psychrobacter arcticus* 273-4, a psychroactive siberian permafrost bacterium, reveals mechanisms for adaptation to low-

temperature growth. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(7):2304–12.

38. Miladi H, Soukri A, Bakhrouf A, Ammar E. Expression of ferritin-like protein in *Listeria monocytogenes* after cold and freezing stress. *Folia Microbiol (Praha).* 2012;57(6):551–6.

39. Varin T, Lovejoy C, Jungblut AD, Vincent WF, Corbeil J. Metagenomic analysis of stress genes in microbial mat communities from Antarctica and the high Arctic. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(2):549–59.

40. Molina-Romero D, Bustillos-Cristales M del R, Rodríguez-Andrade O, Morales-García YE, Santiago-Saenz Y, Castañeda-Lucio M, et al. Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biológicas.* 2015;17(2):24–34.

41. Morley CR, Trofymow JA, Coleman DC, Cambardella C. Effects of freeze-thaw stress on bacterial populations in soil microcosms. *Microb Ecol.* 1983;9(4):329–40.

42. Sun X, Griffith M, Pasternak JJ, Glick R. Low temperature growth, freezing survival, and production of antifreeze protein by the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Can J Microbiol.* 1995;41(9):776–84.

43. Wilson SL, Kelley DL, Walker VK. Ice-active characteristics of soil bacteria selected by ice-affinity. *Environ Microbiol.* 2006;8(10):1816–24.

44. Teixeira LCRS, Peixoto RS, Rosado AS. Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay in maritime

Antarctica. Mol Microb Ecol Rhizosph. 2013;2(8):1105–12.

45. Potts M. Desiccation tolerance: a simple process? Trends Microbiol. 2001;9(11):553–9.

46. Alpert P. Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or rare? J Exp Biol. 2006;209:1575–84.

47. Alpert P. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. Integr Comp Biol. 2005;45(5):685–95.