

República Bolivariana de Venezuela
Universidad de Los Andes
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología
Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS CULTIVABLES
OBTENIDAS A PARTIR DE MUESTRAS DE SUELO EN DOS CUMBRES DE LA
RED GLORIA ANDES EN LA SIERRA LA CULATA ESTADO MÉRIDA**

www.bdigital.ula.ve

Trabajo Especial de Grado presentado
por la Br. Jakeline Coromoto Mendoza Luna
para optar al Título de Licenciada en Biología

Tutor: Johnma Rondón.

Co-tutor: Wileidy Gómez

MÉRIDA-VENEZUELA

2018

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Los Andes y a los profesores de la Facultad de Ciencias que dedicaron su tiempo a mi enseñanza en esta maravillosa carrera.

A la profesora Wileidy Gómez gracias por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por compartir conmigo su amor por la ciencia, por infundir en mí admiración por el mundo de las bacterias psicrófilas que me resulta cada vez más interesante.

Al profesor Johnma Rondón por su enseñanza a lo largo de este proceso de aprendizaje, por compartir conmigo su conocimiento científico; simplemente muchas gracias por su estímulo para seguir creciendo intelectualmente.

Al profesor Luis Llambí y la profesora Lirey Ramírez por su apoyo desde el inicio en este trabajo, gracias por contribuir en mi formación académica y por ser más ameno el trabajo con la ecología

A la profesora Alejandra Melfo, Eloy Torres, Jhonny Márquez, Zulay Méndez por su apoyo durante la realización de este trabajo.

Al profesor Zarack por su buena disposición para evaluar este trabajo y sus sabios consejos.

A Paulina y al laboratorio de Inmunología de Parásitos (LABINPAR) por facilitar los equipos de trabajo.

A mis padres Omar Mendoza y Yenny Luna, para ustedes mi eterno agradecimiento por su esfuerzo, apoyo, amor y confianza incondicional, los Amo

A mi hermano Omar Mendoza, por llenar de alegría mis días y motivarme a crecer en cada momento de mi vida.

A mi abuela Gladys Baptista, mis tíos y primas, por estar siempre aconsejándome y brindándome su apoyo en todo momento.

A mis compañeros Adriana Rojas, Kenia Zambrano, Román González, Ilvanna Salas, Yos Rondón, Edwin Parada, Mayelin Lacruz, Greysa Barrios, Kenia Pérez; Juan Sánchez, Freddy Alarcón, Rafael Aparicio; por el apoyo en los momentos de estrés, por hacerme amenos los días, por su apoyo incondicional, por alcanzar metas y cultivar aprendizajes conmigo a lo largo de esta grandiosa carrera universitaria.

A mis amigos de la infancia Orlando Peña, Daniel Uzcategui, Yokasta Ramos y Lorenzo Cañizales por su buena vibra, por inspirarme a ser mejor y prosperar.

A mis panas Rubén, Sangel, Andrea, Fiamma, Anyoly, Jesús, Joel, Isa, Marbelis, Franco, Jorge, Miguel, María y José Beltran, gente hermosa con muy buen sentido del humor, gracias porque con ustedes compartí muchas experiencias divertidas en ésta maravillosa ciudad.

Gracias a todos por las experiencias vividas, porque con este TEG concluye una etapa importante de mi vida; un período en el que aprendí en las aulas, pero también de mis compañeros y profesores, gente valiosa e interesante de la que me llevo gratos recuerdos.

ÍNDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS.....	I
INDICE DE FIGURAS.....	II
RESUMEN.....	III
INTRODUCCIÓN.....	1
Generalidades de los microorganismos extremófilos.....	1
Psicrofilia en bacterias.....	1
Adaptaciones al modo de vida psicrófilo.....	2
El suelo como hábitat de microorganismos.....	4
Microorganismos que disuelven fósforo.....	5
El páramo como ecosistema.....	7
ANTECEDENTES.....	9
JUSTIFICACIÓN.....	10
HIPÓTESIS.....	11
OBJETIVOS.....	11
GENERAL.....	11
ESPECÍFICOS.....	11
MÉTODOLOGÍA.....	12
1. Área de estudio.....	12
2. Diseño de muestreo.....	14
2.1 Colecta de muestras microbiológicas.....	14
3. Aislamiento y obtención de microorganismos en las cumbres MO6 y PI2.....	15
4. Evaluación de la actividad de disolución de fosfatos.....	15
5. Caracterización morfológica de los aislados obtenidos en los sitios de estudio MO6 y PI2.....	15
5.1 Morfología de la colonia.....	15
5.2 Morfología de la célula.....	16
6. Caracterización fisiológica de los aislados obtenidos en los sitios de estudio MO6 y PI2.....	16
6.1 Determinación cualitativa del crecimiento a diferentes temperaturas.....	16
6.2 Cinética de crecimiento.....	16
7. Caracterización bioquímica de los aislados obtenidos en los sitios de estudio MO6 y PI2.....	17
7.1 Resistencia y tolerancia de los aislados a crecer en varias concentraciones de antibióticos y metales pesados.....	17
7.2 Tolerancia de los aislados a crecer en diferentes concentraciones de NaCl.....	17
7.3 Producción y actividad de enzimas activas a bajas temperaturas.....	17
7.4 Capacidad de los aislados de fermentar la lactosa.....	18
7.5 Pruebas bioquímicas para la identificación de Enterobacterias.....	18
8. Extracción y análisis de ADN plasmídico.....	20
9. Determinación de la inhibición de Fitopatógenos.....	20
10. Parámetros ambientales a medir en el sitio de muestreo.....	20
10.1 Determinación del contenido de materia orgánica del suelo.....	21
10.2 Recolección de datos de temperatura.....	21
RESULTADOS.....	22
3. Aislamiento y obtención de microorganismos en las cumbres MO6 y PI2.....	22
4. Capacidad de disolución de fosfatos determinada en medio NBRIP sólido.....	23
5. Caracterización morfológica de los aislados obtenidos en las cumbres MO6 y PI2.....	25
6. Caracterización fisiológica de los aislados obtenidos en las cumbres MO6 y PI2.....	27
6.1 Determinación cualitativa del crecimiento a diferentes temperaturas.....	27
6.2 Determinación de la cinética de crecimiento para los aislados seleccionados.....	

7. Caracterización bioquímica de los aislados obtenidos en las cumbres MO6 y PI2.....	29
7.1 Resistencia de los aislados de los aislados bacterianos a diferentes concentraciones de antibióticos.....	29
7.2 Tolerancia de los aislados a crecer en varias concentraciones de NaCl.....	29
7.3 Producción y actividad de Enzimas activas a bajas temperaturas.....	30
7.4. Capacidad de los aislados de fermentar la lactosa.....	31
7.5. Pruebas bioquímicas para la identificación de Enterobacterias.....	31
8. Extracción y análisis de ADN plasmídico.....	32
9. Capacidad de los aislados de inhibir el crecimiento de <i>Pythium ultimum</i>	34
10. Parámetros ambientales a medir en el sitio de muestreo.....	35
10.1 Determinación del contenido de materia orgánica del suelo.....	35
10.2 Análisis de datos de temperatura.....	36
11. Comparación funcional de los aislados presentes en las cumbres PI2 y MO6..	40
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	51
PERSPECTIVAS	51
BIBLIOGRAFÍA	52
ANEXOS	59
1. Medios de cultivo.....	59
2. Batería bioquímica para Enterobacterias.....	60
3. Evaluación cualitativa del crecimiento de los aislados a diferentes temperaturas	61
4. Cinética de crecimiento.....	61
5. Producción de biomasa y tasas de crecimiento.....	64
6. Resistencia de los aislados de los aislados bacterianos a diferentes concentraciones de antibióticos.....	65
7. Tolerancia de los aislados a crecer en diferentes concentraciones de metales pesados.....	68
8. Producción de enzimas activas a bajas temperaturas evaluadas en 22 aislados	69
9. Porcentaje de MOS y desviación estándar.....	69

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aislados seleccionados en este trabajo.....	23
Tabla 2. Resumen del número total de aislados evaluados en cada una de las pruebas ensayadas.....	23
Tabla 3. Aislados de la cumbre MO6 con Actividad de Disolución de fosfato tricálcico en medio NBRIP sólido.....	24
Tabla 4. Aislados con Actividad de Disolución de fosfato tricálcico en medio NBRIP sólido.....	24
Tabla 5. Caracterización Morfológica de los veintidós aislados bacterianos seleccionados.....	26
Tabla 6. Grupos de crecimiento para los aislados bacterianos según su tasa de crecimiento μ a diferentes temperaturas.....	27
Tabla 7. Valores de densidad óptica máxima alcanzada por los 22 aislados bacterianos a diferentes temperaturas.....	28
Tabla 8. Crecimiento en medio agar McConkey.....	31
Tabla 9. Pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de Enterobacterias.....	31
Tabla 10. Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>Pythium ultimum</i> realizado a 25 °C por 5 días.....	34
Tabla 11. Porcentaje de MOS y Número de aislados para cada orientación en PI2 y MO6	40
Tabla 12. Comparación funcional de los aislados seleccionados presentes en PI2 y MO6	40

www.bdigital.ula.ve

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES DE LOS MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS

Las condiciones ambientales en numerosas áreas del planeta son extremas desde el punto de vista de los estándares biológicos que se conocen, de modo que en muchas de ellas tan sólo los microorganismos, como únicos representantes de vida en estas zonas, pueden sobrevivir y desarrollarse con la ayuda de mecanismos moleculares adaptativos que hacen frente a bajas o altas temperaturas, presión, salinidad, ambientes ácidos o alcalinos (Gross, 2001). Considerando la creciente y frecuente aparición en el panorama científico de microorganismos supervivientes a condiciones ambientales extremas MacElroy propuso el término Extremófilo para describir, desde el punto de vista antropocéntrico y arbitrario, a cualquier organismo capaz de vivir y crecer en condiciones extremas, es decir, que se desarrollan más allá de los límites que se consideran óptimos o fisiológicos para la vida humana (MacElroy, 1974).

Los microorganismos extremófilos abarcan los tres dominios: Bacteria, Arquea y Eucariota. Fueron descubiertos por primera vez en los manantiales calientes del Parque Nacional de Yellowstone en Estados Unidos por el Microbiólogo Thomas Brock, quien aisló la bacteria gram negativa *Thermus aquaticus*; este descubrimiento en 1960 condujo a la subsecuente búsqueda de microorganismos en ambientes que presentan condiciones hostiles y que permiten evidenciar los procesos de adaptación a estos ambientes extremos (Brock y Freeze, 1969).

Los organismos extremófilos pueden dividirse en dos grandes categorías: verdaderos u obligados, que requieren de una o más condiciones extremas para crecer y multiplicarse, y facultativos o tolerantes, es decir, que pueden tolerar condiciones tóxicas o letales para la mayoría de los organismos vivos, aunque crecen de manera óptima en condiciones normales (Canganella y Wiegel, 2011). A parte de estas categorías antes mencionados, los extremófilos pueden ser agrupados de acuerdo a las condiciones ambientales en las que crecen de manera óptima en: Acidófilos (crecimiento óptimo entre pH1 y pH 5), Alcalófilos (viven por encima de pH9), Halófilos (toleran concentraciones de sal entre 1,5-3 M), Termófilos (se desarrollan entre 60 y 80° C), Hipertermófilos (soportan temperaturas por encima de 80°C), Piezófilos (crecen de manera óptima a alta presión hidrostática), Oligotróficos (adaptados a ambientes nutricionalmente limitados), Metalófilos (crecen en presencia de altas concentraciones de metales) y Psicrófilos (crecen en ambientes con bajas temperaturas inclusive por debajo de 0°C) (Ramírez y col., 2006).

PSICROFÍLIA EN BACTERIAS

Los ambientes con bajas temperaturas se encuentran entre las condiciones más extremas para la vida (Ramli y col., 2013). Más de tres cuartas partes de la superficie terrestre está ocupada por ecosistemas de baja temperatura que han sido colonizados exitosamente por microorganismos extremófilos conocidos como psicrófilos, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (Cayol y col., 2015).

Los ambientes de baja temperatura en los que se desarrollan microorganismos psicrófilos no sólo comprenden las regiones polares, árticas y antárticas, sino también glaciares, zonas de congelación permanente, océanos, zonas montañosas, cuevas, además de algunos ríos y arroyos (Mavingui y col., 2015)

El primer reporte de bacterias capaces de reproducirse a 0 °C fue descrito por Foster en 1887. Años más tarde el término “psicrófilo” fue empleado por Schmidt-Nielsen en 1902 para definir a estas bacterias, pero como sólo se consideró la temperatura mínima de crecimiento en esta definición, creó confusión debido a la falta de diferenciación entre las bacterias “amantes al frío” (psicrófilas) y las “tolerantes al frío” (psicrotolerantes) (Helmke y col., 2003). Morita aclaró la confusión creada por la definición de Schmidt-Nielsen debido a que diferenció las bacterias psicrófilas y las psicrotolerantes, distinguiéndolas por sus temperaturas mínima, óptima y máxima de crecimiento que son, < 0 °C, < 15 °C y < 20 °C para psicrófilas y 0-5 °C, >15 °C y >20 °C para bacterias psicrotolerantes (Morita, 1975). Sin embargo para las bacterias psicrotolerantes sus rangos de temperatura máxima de crecimiento pueden estar por encima de los 20 °C y en algunos casos su temperatura de crecimiento óptimo se encuentra también por encima de los 20 °C. Para que una bacteria sea considerada como psicrotolerante se toma en cuenta su temperatura mínima de crecimiento independientemente de la temperatura óptima de crecimiento (Moyer y Morita, 2007).

Rosa Margesin (2009) toma en cuenta otros parámetros de crecimiento para la definición de microorganismos psicrófilos. Margesin analizó el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de bacterias, levaduras psicrófilas y mesófilas, a través de la determinación de la densidad óptica, el número de células viables y la biomasa celular (peso seco). Los resultados mostraron claramente que, pese a que las tasas de crecimiento son menores, a las temperaturas más bajas, hubo mayor producción de biomasa y que existe una correlación entre los tres parámetros de crecimiento estudiados. De acuerdo a estos resultados, Margesin (2009) propone que la verdadera naturaleza psicrófila está relacionada con la capacidad del organismo de producir mayor cantidad de biomasa a bajas temperaturas (15°C o menos) en lugar de altas tasas de crecimiento (Margesin, 2009).

Russell y colaboradores (1990) sugieren que la capacidad de los microorganismos psicrófilos de crecer a una tasa más lenta a bajas temperaturas les proporciona una ventaja para sobrevivir en ambientes pobres en nutrientes. Según este autor una mayor tasa de crecimiento producirá un rápido agotamiento de los nutrientes y una muerte rápida de la población bacteriana, en consecuencia un crecimiento más lento es compensado con una mayor producción de biomasa.

ADAPTACIONES AL MODO DE VIDA PSICRÓFILO

La fisiología y bioquímica de la célula se modifican por acción de la temperatura para poder proliferar y hacer frente a las alteraciones que ésta provoca. El frío es un estrés que varía los parámetros físico-químicos de la célula alterando las tasas de difusión de solutos; transporte de nutrientes e intercambio de productos; la cinética de las enzimas reduciendo su actividad; la conformación y fluidez de la membrana que disminuye; la flexibilidad; topología e interacciones de macromoléculas como el ADN, el ARN y las proteínas, provocando su desnaturalización y el incorrecto plegamiento, reduciendo la traducción y la división celular, así como la maquinaria transcripcional (Russel, 2000).

- Membrana celular

La composición lipídica de la membrana es la responsable de mantener adecuadamente su fluidez y estructura para que las proteínas membranales puedan llevar a cabo el transporte e intercambio de iones, nutrientes y electrones de manera correcta (Russell, 2000). Cuando la temperatura es muy baja los microorganismos regulan su composición lipídica incrementando el contenido de ácidos grasos insaturados y poliinsaturados (D'Amico y col., 2006).

Otras moléculas asociadas a la membrana pueden jugar un papel importante en la adaptación a bajas temperaturas como son los pigmentos carotenoides, que incrementan la rigidez de la bicapa lipídica (Rodríguez y Tiedje, 2008).

- Proteínas de Choque en frío

Bajo ciertas condiciones de crecimiento celular, y más aún durante el desarrollo a bajas temperaturas en respuesta al estrés térmico, las bacterias son capaces de sintetizar ciertas proteínas llamadas *Cold Shock Proteins* (CSP) o Proteínas de Choque en frío. Una de las funciones principales de estas proteína de estrés, es mantener la estabilidad de la estructura secundaria del ARN y ADN para lograr una mayor eficiencia en los procesos de replicación, transcripción y traducción (Siddiqui y Cavicchioli, 2006).

- Actividad enzimática

Las interacciones hidrofóbicas juegan un papel esencial y central en la estabilidad de las proteínas independientemente del rango de temperatura al que son activas (Franks, 1995). Los puentes de hidrógeno y las interacciones electrostáticas son fuertes a bajas temperaturas, porque su formación es exotérmica mientras que las uniones hidrofóbicas, formadas endotérmicamente, son más débiles en estas condiciones (Russel, 2000). Los organismos psicrófilos hacen frente a la pérdida de flexibilidad de las enzimas mediante cambios en los enlaces intramoleculares, en las interacciones con los solutos y entre

subunidades, mediante compactación y por aumento de residuos polares en detrimento de los hidrofóbicos, incluso, entre subunidades (Russel, 2000). La hipótesis más aceptada para explicar la adaptación de estas enzimas es la que relaciona actividad-estabilidad-flexibilidad (Johns y Somero, 2004), sugiere una modulación de la flexibilidad mediante la reducción de la hidrofobicidad bien en toda la proteína o restringida a aquellas partes implicadas en la catálisis (D'Amico y col., 2006). Algunos de los ejemplos mejor conocidos de este tipo de enzimas son: lactato deshidrogenasa, citrato sintasa, α -amilasa y malato deshidrogenasa (Russel, 2000).

- Proteínas anticongelantes (AFP)

Otra estrategia propia de los psicrófilos con la que hacen frente a las bajas temperaturas para adaptarse es la síntesis de proteínas anticongelantes (AFP por sus siglas en inglés *antifreeze proteins*) juegan un papel importante en la supervivencia a bajas temperaturas, al unirse a los cristales de hielo durante su formación para inhibir su crecimiento, evitando así la lisis celular durante los ciclos de congelación y descongelación (Vincent, 2000).

- Capacidad de prevenir el daño oxidativo

Una de las adaptaciones más importantes en los ambientes fríos tiene que ver con la capacidad de prevenir el daño oxidativo que se genera por un incremento en el estrés oxidativo, un aumento en la solubilidad de los gases y una menor demanda de ATP debido a la acumulación de electrones en la cadena respiratoria; con el fin de prevenir el daño oxidativo, se ha reportado la presencia de genes que codifican para enzimas como catalasas, peroxidasas y superóxido dismutasa (SOD) las cuales proporcionan capacidad antioxidante (Chattopadhyay, 2006). Estas enzimas presentan actividades específicas más elevadas y una mayor flexibilidad de su sitio activo que les proporciona una capacidad antioxidante mejorada (Simon y col., 2009).

- Plásmidos y factores de resistencia

Los Plásmidos codifican una serie de rasgos fenotípicos, y son factores importantes en la transferencia horizontal de genes entre bacterias (Thomas y Nielsen, 2005). Estos elementos genéticos son los vectores más comunes que portan en su estructura genes de resistencia a antibióticos, así como también, a otros factores (Barlow y col., 2008). Este ADN extracromosomal posee tres características clave: la capacidad de replicarse independientemente del cromosoma, la capacidad de ser transferido entre distintos hospedadores y la ausencia de genes esenciales para sus hospedadores (Carattoni, 2009).

Los plásmidos provenientes de microorganismos psicrófilos tienen un particular interés, porque contribuyen directamente con la adaptación de bacterias a su ambiente natural y proporcionan un sistema modelo fácil para la investigación de procesos moleculares básicos (Ochman y col., 2000). Se han encontrado genes que codifican proteínas importantes para la adaptación de las bacterias al frío físicamente asociados a ciertos plásmidos (Zhao y col., 2011); también se han identificado algunos genes que codifican sistemas de adaptación a bajas temperaturas (Dulio y col., 2004). Esto implica que muchos de estos plásmidos son de gran importancia para la supervivencia de estas bacterias a temperaturas congelantes.

EL SUELO COMO HÁBITAT DE MICROORGANISMOS

El suelo constituye un sistema complejo y heterogéneo que alberga una gran riqueza de especies vegetales, animales y microbianas. El suelo es un ambiente muy apropiado para el desarrollo de los microorganismos tanto eucariotas (algas, hongos, protozoos) como procariotas (bacterias y arqueas) (Nogales, 2005). La diferente proporción de los componentes que existen en el suelo le atribuyen a éste características de gran importancia, permitiendo que funciones como la degradación, mineralización e inmovilización de la materia orgánica y de nutrientes se lleve a cabo. Estas características son conocidas como propiedades físicas, químicas y biológicas, que al conjugarse dan paso a interacciones que permiten el crecimiento de plantas y organismos que darán estructura y funcionalidad al suelo. El efecto generado por estas propiedades físicas, químicas y biológicas sobre los microorganismos que allí habitan se ven reflejados en factores como su densidad poblacional y actividad enzimática haciendo que estas aumenten o disminuyan drásticamente (Torres y Lizarazo, 2006).

Las condiciones ambientales están definidas por numerosas variables entre las que se encuentran temperatura, presión, humedad, radiación, pH, salinidad y tipo de nutrientes. Estos parámetros condicionan las especies de microorganismos que se establecen en un hábitat, a su vez, estas especies ejercen una evidente influencia sobre el ambiente. Un ejemplo de ese tipo de interacciones puede describirse para el suelo, allí los microorganismos cumplen con varias funciones muy importantes para el bienestar del ecosistema: participan en la meteorización de las rocas a partir de la producción de metabolitos como amoníaco, ácidos nítrico, sulfúrico, oxálico o cítrico y dióxido de carbono, entre otros; tienen acción enzimática directa sobre otros compuestos oxidándolos o reduciéndolos; son fundamentales en la mineralización de la materia orgánica a través de las rutas de descomposición y participan de forma activa en la formación del humus (Navarro y Navarro, 2000).

La variabilidad y versatilidad metabólica que poseen los microorganismos de una comunidad, se integran a los procesos que tienen lugar en un ecosistema, interviniendo de ese modo en los ciclos de los elementos minerales (N, P, S, Fe) más representativos de cada ambiente. Algunos ejemplos de estas actividades microbianas y sus impactos, son los metabolismos degradativos (celulolíticos, pectinolíticos, proteolíticos) que proveen fuentes de carbono más accesibles para otros miembros del ecosistema, las acciones nitrificantes, desnitrificantes o fijadoras de nitrógeno que poseen diversos microorganismos y la capacidad de oxidación o reducción de distintos compuestos y elementos como oxígeno, azufre, hierro, para hacerlos accesibles a otras especies (Nunan y col., 2003).

En la mayoría de los suelos el reservorio principal de nutrientes se encuentra presente en los compartimientos de la materia orgánica y en el suelo mineral, con solamente una pequeña cantidad disponible para las plantas en un corto tiempo. La materia orgánica del suelo es heterogénea con respecto a la actividad biológica y la biomasa microbiana por si misma representa una fuente significativa de nutrientes (Navarro y Navarro, 2000).

Los microorganismos del suelo son uno de los indicadores biológicos más sensibles a los cambios de condiciones ambientales, siendo estos importantes a la hora de detectar perturbaciones o disturbios en el ecosistema (Roper y Ophel, 1997). En este sentido, un aspecto importante a considerar es que ciertos parámetros, grupos taxonómicos y funcionales de microorganismos son más sensibles que otros a los cambios o perturbaciones del ecosistema. Roper y Ophel (1997), estudiaron el efecto de diferentes agroquímicos sobre la microflora del suelo, establecieron los siguientes grupos y funciones de alta sensibilidad:

1. Bacterias que tienen como función degradación de nitrificantes (Actinomicetos, Rhizobium) y funciones (Degradación de la materia orgánica, nitrificación) de alta sensibilidad.
2. Grupos (Población general de bacterias, hongos o algas) y funciones (respiración del suelo, desnitrificación, amonificación) de mediana sensibilidad.
3. Grupos (Población de Azotobacter, amonificantes, proteolíticos) y funciones (fijación aeróbica del nitrógeno) de baja sensibilidad.

Los microorganismos del suelo pueden ser clasificados en grupos funcionales de acuerdo a los procesos biológicos que realizan, entre los cuales se encuentran los proteolíticos, amilolíticos, celolíticos, pectinolíticos, solubilizadores de potasio, solubilizadores de fósforo y fijadores de nitrógeno. Esta diversidad microbiana está directamente relacionada con la estabilidad del ecosistema, lo cual sugiere que para mantener la continuidad de los procesos biológicos, si no existe una especie determinada que realiza algún ciclo bioquímico debe estar otra que cumpla con la misma función (Kennedy, 1999).

Grupos funcionales como bacterias solubilizadoras de fósforo y potasio son relevantes a la hora de hacer un estudio de suelos, ya que, liberan y aportan, por medio de distintos mecanismos (solubilización por ácidos orgánicos y producción de enzimas) elementos (P y K), productos secundarios que son fundamentales para el crecimiento, desarrollo de plantas y organismos en un ecosistema (Sáenz, 2009). Además se observa la participación de los elementos liberados en procesos de formación de carbohidratos, proteínas, ATP, fosfolípidos y ácidos nucleicos, así como la intervención durante la fotosíntesis, procesos de turgencia celular y regulación de la presión osmótica, por último se resalta su participación en la producción de la mayoría de fertilizantes y biofertilizantes (Bobadilla, 2008).

MICROORGANISMOS QUE DISUELVEN FÓSFORO

La movilización del P en el suelo implica el intercambio del mismo entre los depósitos orgánicos e inorgánicos, así como entre las formas solubles e insolubles. En estos procesos, los microorganismos del suelo cumplen un papel principal en la disolución y mineralización del P (Coyne, 2000). Los microorganismos del suelo deben absorber el P directamente de la solución del suelo o disolverlo activamente para su consumo, incorporándolo a la biomasa, favoreciendo indirectamente la asimilación de carbono y la fijación de nitrógeno (Cole y Heli, 1981).

A concentraciones bajas de P en el suelo, los microorganismos acumulan un exceso del mismo a nivel intracelular para cubrir sus necesidades metabólicas. En efecto, después de ser incorporado a las células, el P se convierte en ésteres de fosfato o ATP y se almacena en forma de polifosfatos (Coyne, 2000).

Los microorganismos del suelo que tienen la capacidad de disolver fosfatos inorgánicos poco o casi insolubles han sido denominados “organismos que disuelven fosfatos minerales” o DFM⁺ (MPS⁺, del inglés *Mineral Phosphate Solubilization*) y representan hasta un 10 % de la población microbiana del suelo (Coyne, 2000).

Existen tres mecanismos básicos para disolver el de Fósforo inorgánico (P_i) de forma que el mismo se encuentre disponible para plantas y microorganismo: a) quelación, b) reducción del hierro y c) acidificación. Todos estos procesos desestabilizan la estructura cristalina de los minerales que contienen P_i, contribuyendo así a su disolución (Coyne,

2000). Algunos compuestos orgánicos sintetizados por los microorganismos, como por ejemplo ciertos ácidos orgánicos, pueden quelar cationes (Ca^{2+} , Mg^{2+} y Fe^{3+}). Sin embargo, la disolución de fosfatos mediada por algunos microorganismos es generalmente atribuida a la actividad de la enzima glucosa deshidrogenasa (GDH; EC 1.1.99.10), una quinoproteína dependiente del cofactor pirrolo-quinolina (PQQ), la cual se encuentra unida a la membrana citoplasmática y está involucrada en la vía de oxidación directa de glucosa en bacterias (Goldstein, 1995).

La vía de oxidación directa de la glucosa (VODG) es una de las principales rutas metabólicas para el metabolismo de la glucosa en bacterias. Las enzimas de la VODG están embebidas en la membrana plasmática, con sus sitios activos orientados hacia el periplasma, de manera tal que los ácidos orgánicos sean producidos en este último, difundiendo luego hacia el medio extracelular.

La primera enzima de esta vía es la glucosa deshidrogenasa (GDH) que cataliza la conversión de glucosa a ácido glucónico ($\text{pK}_a = 3,4$); éste es luego transformado en ácido 2-cetoglucónico ($\text{pK}_a = 2,6$) por la enzima gluconato deshidrogenasa (GADH) y este último oxidado a ácido 2,5-diketoglucónico ($\text{pK}_a = 2,4$) por la enzima 2-cetogluconato deshidrogenasa (2KGADH) (Goldstein, 1995). Estos ácidos orgánicos poseen estructuras químicas como grupos hidroxilo y carboxilo que les permiten quelar cationes metálicos para formar complejos estables, que originan sales de fosfatos y por lo tanto liberan el fósforo soluble a la solución del suelo (Stevenson, 2005). Se ha demostrado que varios ácidos orgánicos pueden disolver indirectamente fósforo a partir del suelo tales como: ácido cítrico, oxálico, glutámico, láctico, succínico, entre otros (Rodríguez y Fraga 1999). Sin embargo, los ácidos más efectivos en la disolución de fosfatos son el glucónico y 2-cetoglucónico, probablemente debido a sus bajos pK_a (Kim y col., 2002).

El estudio de la capacidad de disolver fosfatos minerales (DFM^+) a bajas temperaturas se ha visto incrementada en los últimos 15 años, a través de la creación de mutantes psicotolerantes a partir de cepas DFM^+ bien conocidas, o del aislamiento de microorganismos con estas características a partir de muestras de suelo obtenidas de regiones montañosas. De hecho, el primer reporte de disolución de fosfatos a bajas temperaturas fue realizado por Das y col., (2003), quien estudió cepas mutantes del género *Pseudomonas* psicotolerantes con capacidad de disolver fosfatos inorgánicos a bajas temperaturas (10°C), encontrando que este proceso mediado por dichas cepas mutantes es más eficiente con respecto a la cepa silvestre. Posteriormente, Katiyar y Goel (2003) complementan el trabajo de Das al observar que dichos mutantes son capaces de incrementar el crecimiento de trigo y frijol mungo a 10°C en condiciones tanto *in vitro* como *in situ*. Trivedi y Sa (2008) obtuvieron mutantes a partir de una cepa psicrófila de *Pseudomonas corrugata* y observaron que estos mutantes presentaban una mayor actividad DFM^+ a 4, 9 y 28°C con respecto a la cepa silvestre; esta capacidad de disolución de fosfatos estaba relacionada con una gran acidificación del medio de cultivo debido a la producción de ácidos orgánicos. La capacidad de disolución de fosfatos también ha sido reportada en algunas cepas del género *Bacillus*, como es el caso de *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium*, las cuales se ha demostrado son capaces de promover el crecimiento de cultivos de mostaza india y han sido consideradas inoculantes prometedores para cultivos en regiones montañosas (Kumar y col., 2013).

Algunas especies de bacterias como *Pseudomonas corrugata* (Trivedi y Sa, 2008) y *Pseudomonas fluorescens* (Katiyar y Goel, 2003), bacterias psicotolerantes nativas como *Pantoea dispersa* (Selvakumar y col., 2008), *Pseudomonas fragi* (Selvakumar y col., 2009), *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Pantoea agglomerans*, *Burkholderia vietnamiensis* y *Pseudomonas lurida* M2RH3 (Selvakumar y col., 2011) son conocidas por su actividad DFM^+ a baja temperatura. Cabe destacar que el género *Pseudomonas* es uno de los más relevantes ya que incluye a gran parte de los microorganismos psicotolerantes que disuelven fosfatos identificados hasta ahora, seguido por el género *Bacillus*. Brevemente, *Pseudomonas* es un género muy diverso de Gammaproteobacterias, y se considera un miembro fundamental de las comunidades microbianas del suelo. Los miembros de este género se han aislado de básicamente todos los entornos estudiados incluyendo los suelos alpinos, donde se identificó como el género cultivable más prevalente. La VODG ha sido muy bien

descrita en este género debido a la importancia de esta ruta metabólica para la disolución de fosfatos por bacterias Gram negativas (Goldstein, 2000). El género exhibe una notable variación y flexibilidad metabólica que le permite vivir en ambientes variables. Una estrategia de supervivencia ha sido la evolución de cepas que son capaces de utilizar un gran número de diferentes fuentes de carbono para su crecimiento, lo cual es un hecho importante ya que el medio ambiente alpino es muy heterogéneo (Mishra y col., 2010).

Este último aspecto es de gran importancia, pues el estudio y caracterización de bacterias psicrófilas con actividad DFM⁺ a baja temperatura abriría la posibilidad de generar bioinoculantes que permitan promover el crecimiento vegetal de forma eficiente en zonas montañosas (alpinas, sub alpinas y páramos) para el establecimiento de una agricultura sustentable. Por otro lado, desde un punto de vista eminentemente básico, el estudio y la caracterización de este tipo de cepas bacterianas con actividad DFM⁺ a baja temperatura significaría un avance importante en este campo.

EL PÁRAMO COMO ECOSISTEMA

El páramo es un ecosistema de alta montaña caracterizado por su alta diversidad y endemismo, explicada por la heterogeneidad de los patrones bioclimáticos y físicos de la cordillera de los Andes, los cuales se evidencian en sus gradientes ambientales y edáficos, así como por su historia geológica y climática (Kattan y col., 2004).

En los Andes Tropicales los ecosistemas por encima de la línea continua de los bosques se denominan páramos. En Venezuela, el páramo andino se ubica aproximadamente a partir de los 3000 m.s.n.m. y la cota a partir de los 4.000 m.s.n.m. representa el ecotono páramo altiandino, que distingue dos formaciones vegetales importantes: el páramo desértico (piso subnival 4.000 a 4.500 m.s.n.m) y el desierto periglacial (piso nival 4500 a 4800 m.s.n.m) (Monasterio, 1980).

El páramo reúne una confluencia particular de condiciones predominantes, como son las bajas temperaturas, altos niveles de radiación solar, gran variabilidad térmica diaria (Sarmiento, 1986). Esta diferencia térmica diaria en la superficie del suelo puede ir desde 45°C en un día despejado, hasta los - 4°C en una noche fría con una amplitud de más de 50°C. A su vez, la variabilidad térmica es mayor durante la época seca (en aquellas zonas donde hay una estacionalidad hídrica marcada) y es menos intensa en la época de lluvia, lo que demuestra una relación entre las variaciones de amplitud térmica diaria con respecto a la estacionalidad anual que presentan las precipitaciones (Azócar y Rada, 2006).

La vegetación más característica está representada por el Rosetal alto y abierto que consta fundamentalmente de dos estratos de vegetación el primero formado por individuos adultos de los género *Espeletia* y *Coespeletia*, con una altura de 1-3 m, su cobertura varía entre 5 y 30% y el segundo estrato, ubicado muy cercano al suelo, formado principalmente por plantas de cojín, gramíneas e individuos juveniles de los género *Espeletia* y *Coespeletia*, cuya cobertura varía entre 2 y 40% (Monasterio, 1980).

En los páramos el componente de la biota que ha recibido mayor atención es, de hecho, la vegetación. Su flora es relativamente bien conocida y aunque existen muchas localidades que no han sido estudiadas; se ha reportado que en términos de plantas vasculares son los ecosistemas más diversos de las altas montañas del mundo (Llambí y col., 2013).

Recientemente, el rango de variabilidad climática natural ha empezado a sobrepasar los umbrales históricamente documentados. Es particularmente preocupante la tendencia general de calentamiento y sus consecuencias sobre la integridad de los ecosistemas y las poblaciones humanas que dependen de ellos.

Para enfrentar el problema del cambio climático mundial, la Organización Meteorológica Mundial y el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente crearon el Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC). El IPCC analiza la información científica, técnica y socio-económica relevante para entender el fenómeno del cambio climático. Una herramienta clave en el análisis del impacto de cambio climático son los modelos globales de clima (GCMs), los cuales se usan para generar proyecciones cuantitativas del cambio climático al futuro. Los modelos creados por la IPCC, predicen que se espera un incremento de la precipitación sobre los Andes entre 0% y 10%, junto con un incremento de la temperatura de alrededor de 1°C (período 2010 – 2039) hasta 3°C (2040 – 2079) (IPCC, 2013).

Para una evaluación integral de los impactos ecológicos del cambio climático en los ecosistemas naturales y seminaturales, son importantes los modelos predictivos o experimentales y los estudios de observaciones a largo plazo. En este sentido la Iniciativa Global de Observación e Investigación de los Ambientes Alpinos (GLORIA) centra su planteamiento en la observación a largo plazo, mediante la puesta en marcha de una red mundial de zonas piloto eficaz para observar *in situ* las comunidades terrestres en áreas de montaña. Los ecosistemas alpinos cumplen estos requisitos porque se dan en todos los continentes y en los principales biomas de la Tierra, por lo general están condicionados por las bajas temperaturas y se espera que respondan al cambio climático (Pauli y col., 2015).

El proyecto GLORIA mantiene una red operativa de observación y monitoreo a largo plazo de la biodiversidad, la temperatura y los patrones de vegetación a nivel global, con una metodología estandarizada para hacer un seguimiento que permita comprender las respuestas de la biota alpina al cambio climático. Se trata de identificar indicadores globales de los impactos del cambio climático sobre la biodiversidad de los ambientes naturales o seminaturales y más concretamente, de evaluar los riesgos de pérdida de biodiversidad a gran escala partiendo de la escala regional, así como, calibrar la vulnerabilidad de los ecosistemas de la alta montaña sometidos a la presión del cambio climático. Actualmente la red a nivel mundial cuenta con más de 115 sitios de trabajo en los cinco continentes, en América del Sur, la Red Andina de Monitoreo de la Biodiversidad en Alta Montaña (GLORIA-Andes) cuenta con 15 sitios en Argentina, Bolivia, Perú, Ecuador, Colombia y Venezuela. (Pauli y col., 2015).

Venezuela se une a la red GLORIA en el 2012 con dos sitios de monitoreo a largo plazo, uno en el Páramo de Gavidia del Parque Nacional Sierra Nevada y otro en el Páramo de Piedras Blancas en el Parque Nacional La Culata. Estas cumbres monitoreadas a largo plazo tienen el objetivo de documentar los impactos ecológicos para conocer las respuestas y estrategias de adaptación de las especies ante el cambio climático (Llambí y Ramírez; 2017).

La Red Andina de Monitoreo de la Biodiversidad en Alta Montaña (GLORIA-Andes); cuenta con dos sitios de trabajo: La Culata-Piedras Blancas (CPB, instalado durante el año 2012) con 3 cumbres de monitoreo: Piñango 2 (Código:PI) a 4.207 m, Piedras Blancas 4 (Código:PB4) a 4.402 m y Mordor 6 (Código:MO6) a 4.604 m de elevación y Gavidia-Sierra Nevada (GSN), instalado durante el año 2014 con 4 cumbres de monitoreo: Piedras Bonitas 8 (Código:PB8) a 3.810 m, Piedras Bonitas 9 (Código:PB9) a 3.928 m, Santo Cristo 1 (Código:SC1) 4.144 m y Santo Cristo 2 (Código:SC2) la 4.270 m. Cada una de estas cumbres cuenta con un diseño de monitoreo que consiste en parcelas de 3x3 m situadas en las cuatro direcciones principales correspondientes a los puntos cardinales (Norte, Sur, Este,

Oeste) y en el centro de la parcela mantiene un registro continuo de temperaturas a 5 cm del suelo (Pauli y col., 2015).

ANTECEDENTES

La visión científica microbiológica se ha centrado en caracterizar microorganismos en ambientes extremos, donde la mano del hombre no haya interferido con estos microcosmos. Los científicos han reconocido que los microorganismos ocupan una posición clave en el flujo ordenado de materia y energía a través del ecosistema global, en virtud de sus capacidades metabólicas (Atlas y Bartha, 2002).

Tras una fase inicial de reconocimiento de la alta diversidad microbiana y la caracterización molecular de diversos suelos, el interés de la diversidad microbiana se ha incrementado considerablemente en ambientes extremos, en especial de bacterias y hongos. El interés se debe, a sus características especiales y a las propiedades de sus enzimas que probablemente tienen un gran potencial como recursos de aplicación en la biotecnología, abriendo una gran oportunidad para realizar investigaciones científicas importantes en el campo de la microbiología, posibilitando aportes significativos (Atlas y Bartha, 2002).

En los Páramos Tropicales han sido escasos los reportes de microorganismos aislados a partir de suelo, sin embargo se ha logrado examinar el crecimiento de hongos y bacterias provenientes de suelos paramuros como un parámetro de gran importancia que proporciona un potencial y beneficio a la hora de buscar nuevas cepas productoras de metabolitos debido a su adaptabilidad a condiciones adversas.

Benavides y Hermida (2008) logran aislar cepas bacterianas a partir de muestras de suelo de los Páramos Colombianos de Cruz Verde y Guasca mediante técnicas dependientes de cultivo como son la dilución seriada y dispersión directa. Para la identificación morfológica de las cepas bacterianas aisladas emplearon la caracterización microscópica por tinción de gram y caracterización macroscópica por comparación entre las características de crecimiento, pigmentación, tipo de borde y tamaño. Para la identificación bioquímica utilizaron las pruebas de: oxidasa, catalasa y baterías bioquímicas, las cuales permiten determinar el metabolismo de las bacterias, logrando identificar 40 cepas bacterianas correspondientes a los siguientes géneros *Amphibacillus*, *Bacillus*, *Brochothrix*, *Caryophanon*, *Kutthia*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Sacharococcus*, *Sarcina*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina*, *Staphylococcus* y *Trichoccus*. Estas cepas bacterianas identificadas metabolizan compuestos con efecto bactericida, antifúngico, bacteriostáticos y biocontroladores de plagas, estas cepas pueden ser utilizadas en la innovación en áreas biotecnológicas y bioquímicas (Benavides y Hermida, 2008).

La identificación y aislamiento tanto de hongos como bacterias solubilizadoras de fosfato presentes en ambientes extremos expuestos a las bajas temperaturas resulta atractivo e importante, puesto que estos microorganismos juegan un rol fundamental en el ciclaje de fósforo en los suelos, gracias a su actividad las plantas pueden aprovechar las grandes reservas de fósforo insoluble que se encuentran fijado a los minerales del suelo.

En el Páramo de Rabanal en Colombia se han reportado microorganismos que pueden promover el crecimiento y desarrollo de las plantas a bajas temperaturas. Hongos aislados de la rizosfera de cultivos de papa (*Solanum tuberosum*) se determinó que pertenecían a los géneros *Scopulariopsis* sp y *Penicillium* sp. Se encontró que los aislados presentaron actividad solubilizadora de fosfato en medio selectivo NBRIP. Estas cepas fúngicas reportadas son importantes para la aplicación en la elaboración de biofertilizantes en los suelos, constituyendo una estrategia de fertilización sostenible que contribuye a la mitigación de la contaminación de zonas estratégicas como los páramos (Beltran, 2014).

En Venezuela se han aislado cepas bacterianas aisladas a partir de muestras de hielo de los glaciares de la Sierra Nevada de Mérida (Estado Mérida). Para la obtención de las cepas se emplearon métodos dependientes de cultivo y métodos basados en el secuenciamiento del gen ADNr 16S para determinar la ubicación filogenética de los aislados; dichos aislados estaban distribuidos dentro de cuatro diferentes phylum/clases: *Beta*- y *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*. Este reporte de comunidades bacterianas en glaciares Tropicales constituye una novedad y señala la necesidad de preservar este reservorio genético, ya que debido al retroceso de los glaciares en el parque Nacional Sierra Nevada en Mérida Venezuela; la flora bacteriana está en un proceso de desaparición indetenible (Rondón y col., 2016).

Balcazar y colaboradores (2015) reportan el aislamiento, caracterización e identificación de un grupo numeroso de bacterias psicrófilas capaces de disolver fosfatos inorgánicos, altamente insolubles, de manera muy eficiente y a bajas temperaturas. Estos aislados fueron obtenidos a partir de muestras de hielo provenientes de los glaciares ubicados en los picos Humboldt (4900 m.s.n.m) y Bolívar (4950 m.s.n.m), localizados en el Parque Nacional Sierra Nevada del Estado Mérida, Venezuela. Los aislados pertenecientes al género *Pseudomonas* presentaban resistencia a múltiples antibióticos y metales pesados. Los autores afirman que la disolución de fosfato tricálcico es dependiente de la síntesis y secreción de ácidos orgánicos, probablemente el ácido producido sea el ácido glucónico, a través de la vía de oxidación directa de la glucosa. Igualmente demuestran que esta disolución depende de la fuente de carbono suministrada a los cultivos bacterianos, así como, de la temperatura de incubación (15°C). Así mismo, comprueban que algunos de los aislados son productores de compuestos involucrados en la promoción del crecimiento vegetal, como es el caso del ácido indol-acético (AIA) y la producción de sideróforos que permiten la quelación y captación de hierro. Además determinaron que alguno de los aislados fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Pythium ultimum*, un fitopatógeno que afecta diversas plantas de importancia económica en la agricultura. El potencial uso de este grupo de bacterias como insumos para el desarrollo de procesos de biofertilización de cultivos agrícolas en regiones montañosas, con suelos pobres en fósforo soluble y sometidos a bajas temperaturas a lo largo del año, surge como una posibilidad a futuro (Balcazar y col., 2015).

JUSTIFICACIÓN

Los microorganismos presentes en ecosistemas Altiandinos son vulnerables frente a los cambios de temperatura, ya que su diversidad y densidad podrían ser alteradas. En Venezuela los trabajos asociados a investigaciones microbiológicas en ecosistemas altiandinos son escasas, es más, se podría afirmar que esta investigación se establece como la primera en su tipo, aportando una línea de investigación que permite conocer las adaptaciones y las funciones ecológicas que estos microorganismos cumplen en los ecosistemas a bajas temperaturas. Por tal razón se tiene como finalidad aportar a este proyecto el aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfato y que estas a futuro, puedan implementarse en diferentes aplicaciones como biofertilizantes, biología molecular, biorremediación y biotecnología.

Como objetivo a futuro esta investigación del componente microbiológico puede contribuir a complementar el estudio de la red de monitoreo GLORIA-Andes, dando respuesta a preguntas claves relacionadas con el grado de sensibilidad y sus tolerancias ecológicas presentes en los diferentes escenarios de cambio climático que pudieran afectar la composición y diversidad de las especies microbianas que habitan en este ecosistema altiandino.

HIPÓTESIS

La colonización de ambientes de alta montaña por parte de especies vegetales obedece a condiciones climáticas, edáficas y microbiota presente. La comparación de la diversidad de microorganismos presentes en cumbres de alta montaña separadas por aproximadamente 400 metros de altitud, podría mostrar diferencias significativas en cuanto a la riqueza y composición de dichas comunidades por efecto de la disminución de la temperatura y MOS a medida que incrementa la altitud.

OBJETIVOS

GENERAL:

Aislar y caracterizar microorganismos psicrófilos/psicrotolerantes en cumbres de alta montaña tropical en los Andes Venezolanos.

ESPECÍFICOS:

- Recolectar muestras de suelo de dos cumbres del Páramo de Piedras Blancas y aislar microorganismos psicrófilos y/o psicrotolerantes.
- Incorporar los aislados obtenidos a la Colección Venezolana de Microorganismos Psicrófilos de la Universidad de Los Andes.
- Determinar la efectividad de diferentes medios de cultivo para el crecimiento de microorganismos psicrófilos, a partir de muestras de suelo.

- Identificar los aislados bacterianos capaces de disolver fosfatos minerales a bajas temperaturas.
- Caracterizar morfológica, bioquímica y fisiológicamente los microorganismos psicrófilos aislados.
- Evaluar la presencia de componentes inhibitorios de fitopatógenos.
- Determinar el perfil plasmídico de los aislados bacterianos.
- Analizar los datos de temperatura de los dos sitios de muestreo suministrados por la red GLORIA-Andes.
- Determinar el contenido de materia orgánica en muestras de suelo de las dos cumbres de muestreo.
- Comparar las comunidades microbianas para establecer relaciones o diferencias entre los microorganismos psicrófilos y/o psicotolerantes aislados.

METODOLOGÍA

1. ÁREA DE ESTUDIO

El Páramo de Piedras Blancas, se encuentra al noroeste de los Andes venezolanos en el Estado Mérida, a 8° 52'N y 70° 54'W; Se extiende entre aproximadamente 3700 y 4700 m.s.n.m. Piedras Blancas pertenece al Parque Nacional Sierra La Culata; se encuentra dentro de la unidad ecológica de Páramo Altiandino, ubicado en los pisos subnival y nival; con una distribución discontinua de vegetación y grandes superficies de suelo desnudo (Pérez, 1995).

Piedras Blancas exhibe un régimen pluviométrico unimodal, con menos de 800 mm de precipitación anual y con una fuerte estacionalidad. Presenta una época de sequía que va de Diciembre a Marzo y una época de húmeda que va de Abril a Noviembre; entre estos, los meses que reciben la mayor concentración de precipitación corresponden al período de mayo a agosto; donde la media mensual es mayor a 100 mm. La precipitación ocurre principalmente en forma de lluvia, aunque la nieve y el granizo son frecuentes, especialmente durante la temporada de lluvias (Pérez, 1991; Azócar y Rada, 2006).

El Páramo de Piedras Blancas experimenta amplias fluctuaciones térmicas diarias; con un promedio anual de 2,8°C. La amplitud térmica es de aproximadamente 50°C en la superficie del suelo y 17°C a 10 cm profundidad (Monasterio, 1986). El lugar se caracteriza por laderas, afloramientos rocosos y depresiones o fondo de valle. Los suelos son poco profundos y ácidos, tienen una textura gruesa, con un alto porcentaje de grava y arena, un bajo contenido de materia orgánica (Pérez, 1995).

GLORIA-Andes mantiene una red de monitoreo en La Culata Piedras Blancas que incluye tres cumbres de monitoreo entre los 4.207 y los 4.604 m de elevación. Las cumbres Piñango 2 (PI2) a 4.207 m.s.n.m. y Piedras Blancas 4 (PB4) a 4.402 m.s.n.m pertenecen a la unidad ecológica de páramo desértico (piso subnival) (Monasterio, 1980). Fisionómicamente, el Páramo desértico es un rosetal alto y abierto que consta de dos estratos: el más alto formado exclusivamente por rosetas caulescentes siempre verdes pertenecientes al complejo *Espeletia*. El segundo estrato se encuentra a ras del suelo, sobrepasándolo escasos centímetros presenta como formas de vida dominantes plantas en cojines densos y roseta acaule de porte pequeño siempre verde; otras formas de vida presentes incluyen las hierbas erectas y postradas, los arbustos esclerófilos y varias especies de gramíneas de pequeño porte (Monasterio, 1980).



Figura 1. Cumbre Piñango 2 (PI2) a 4.207 m perteneciente a la Unidad ecológica de Páramo desértico en la Sierra la Culata, Estado Mérida.

La vegetación característica de PI2 (Figura 1) está dominada por las rosetas gigantes de *Coespeletia timotensis* y *C. spicata*; también son característicos los cojines de especies como *Azorella julianii*, *Arenaria musciformis*; hierbas erectas como *Oxylobus glanduliferus* y *Gamochaeta purpurea* (Llambí y Ramírez, 2017).



Figura 2. Cumbre Mordor 6 (MO6) ubicada en el desierto periglacial a 4.604 m.s.n.m. en la Sierra la Culata, Edo Mérida

La tercera cumbre (Figura 2) Mordor 6 (MO6) está ubicada en el desierto periglacial a 4.604m.s.n.m. El desierto periglacial (piso nival) consta de un único estrato de vegetación, que no sobrepasa los 40 cm de altura; incluyendo formas no vasculares, siendo las formas de vida dominantes las mismas que ocupan el estrato inferior del páramo desértico (Monasterio 1980; Ataroff y Sarmiento, 2004).

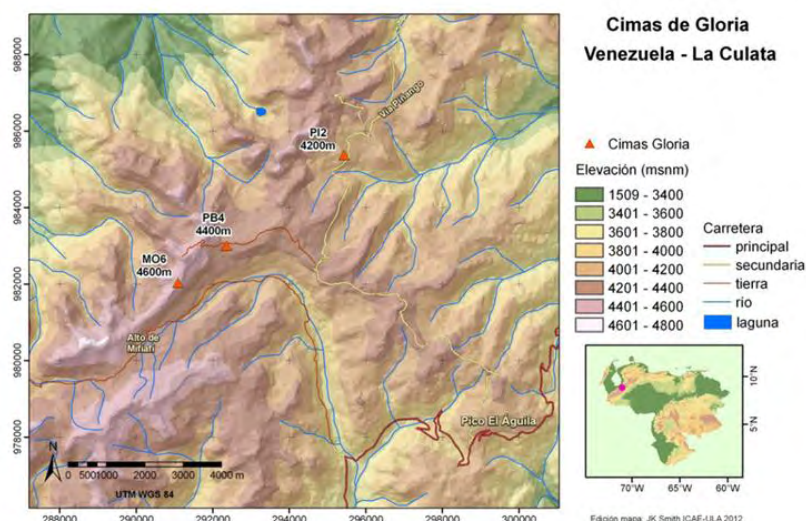


Figura 3. Ubicación de las cumbres PI2 y MO6 seleccionadas como sitios de muestreo

Los datos obtenidos por la línea base GLORIA Andes Venezuela describen para el sitio La Culata-Piedras Blancas que la cumbre PI2 presenta un alto porcentaje de plantas vasculares (82.2%) y un índice de diversidad Shannon de 2.7, y para la cumbre MO6 señalan que cuenta con un bajo porcentaje de plantas vasculares alrededor del 9% con un índice de diversidad Shannon de 1.9; en La Culata-Piedras Blancas la riqueza y cobertura total de plantas vasculares muestra una tendencia general a disminuir con la elevación (Llambí y Ramírez; 2017).

2. DISEÑO DE MUESTREO

2.1 Colecta de muestras microbiológicas

Para el área de estudio se seleccionaron dos cumbres de monitoreo de la red GLORIA-Andes. Las cumbres Piñango 2 (PI2) a 4.207 m.s.n.m. y Mordor 6 (MO6) 4207 m.s.n.m.; para ambas cimas el diseño de monitoreo de la red son parcelas de 3x3 m (figura 4) situadas en las cuatro direcciones principales correspondientes a los puntos cardinales (Norte, Sur, Este y Oeste).

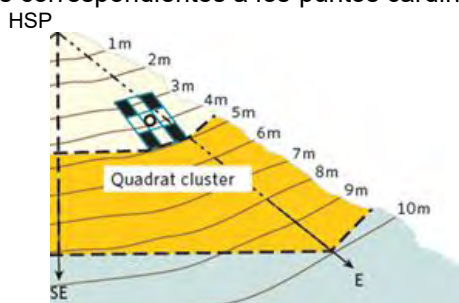


Figura. 4 Diseño esquemático de una cima modelo GLORIA, mostrando las parcelas de monitoreo de 3x3 m en las áreas cimaras, ubicadas en la dirección de los cuatro puntos cardinales.

*(HSP) punto culminante área cimera superior (5 m) área cimera inferior (10 m)

Las muestras de suelo en MO6 se colectaron en Noviembre 2016 y para la cumbre PI2 en Marzo 2017; para ambas cumbres las muestras fueron colectadas fuera de las parcelas de monitoreo de la red (figura 5); dos replicas por cada cara (Norte, Sur, Este y Oeste) para un total de ocho muestras por cumbre. Para la toma de muestras de suelo primero se descartó la hojarasca y material orgánico más superficial con ayuda de una pala; seguidamente y de forma aséptica se utilizó un tornillo de acero inoxidable esterilizado con fuego y etanol; dicho tornillo permitía colectar cilindros de suelo hasta una profundidad de 10 a 15 cm; las muestras fueron almacenadas en tubos falcón estéril, manteniéndose en una cava; y luego fueron trasladados al laboratorio.

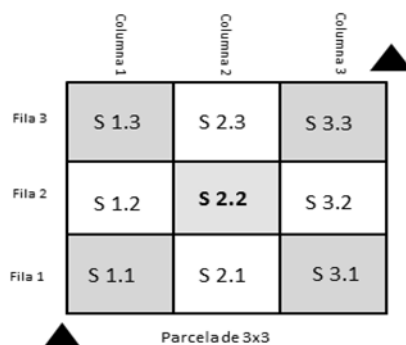


Figura 5. Esquema de una parcela de monitoreo GLORIA Andes Venezuela, especificando con triángulos negros los puntos donde se realizó la colecta de muestras de suelo para el aislamiento de microorganismos en las cumbres PI2 y MO6.

* ▲ Indica el lugar donde se tomaron las muestras de suelo

* La parcela de monitoreo GLORIA está dividida en cuadrados que constan de 3 dígitos. 1er. dígito: es una letra que denota la dirección geográfica principal o punto cardinal de la parcela; 2º dígito: es el número de la columna de la parcela, numerada de izquierda a derecha (siempre mirando hacia la cima), y 3er. dígito: es un número que nos indica la fila del grupo numerada de abajo arriba (orientados hacia la cima)(Pauli y col., 2015).

3. AISLAMIENTO Y OBTENCIÓN DE MICROORGANISMOS EN LAS CUMBRES MO6 Y PI2

Las muestras de suelo contenidas en los tubos falcón se pesaron en una balanza y se unieron ambas réplicas de cada orientación para formar una sola muestra única por orientación; las muestras de suelo se vertieron en fiolas estériles para ser tratadas con solución fisiológica estéril (0,9% P/V), hasta alcanzar un homogenato al 1% p/v. Se agitaron durante 30 min permitiendo la liberación de los microorganismos y, que el suelo sedimentara pudiendo trabajar con el sobrenadante. Partiendo del sobrenadante sin diluir (SD) como solución stock se realizaron diluciones seriadas en tubos de vidrio estériles (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}). Posteriormente se sembraron con rastrillo en placas de Petri 200µl del homogeneizado (SD, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), en medio agar Malta (AM), Papa Dextrosa (PD), Papa Zanahoria (PZ), Luria Bertani (LB), R2A (Anexo 1); las placas se incubaron a 10 °C por un periodo de siete días para permitir el crecimiento de los microorganismos.

Las colonias que presentaron diferencias fenotípicas se reaislaron hasta garantizar la pureza de las mismas. Los aislados puros se almacenaron en suspensiones celulares congeladas en tubos de criopreservación a -20 °C en caldo R2A con glicerol al 20% (v/v), estos aislados pasaron a formar parte de la Colección Venezolana de Microorganismos Psicrófilos (CVMP).

Para seleccionar un determinado número de morfotipos bacterianos y facilitar su caracterización, se escogieron 3 criterios basados en: ① su función en el ecosistema, si estos aislados son capaces de disolver fosfatos minerales a bajas temperaturas; ② Su actividad metabólica activa a bajas temperaturas, evaluada a través de la determinación cualitativa del crecimiento a diferentes temperaturas; ③ la resistencia a antibióticos y la tolerancia a metales pesados que permite establecer un perfil de resistencia único entre cada uno de los aislados bacterianos evaluados, asegurando que sean especies distintas los aislados seleccionados.

4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE DISOLUCIÓN DE FOSFATOS DE LOS AISLADOS OBTENIDOS EN LOS SITIOS DE ESTUDIO MO6 Y PI2

La capacidad de disolver fosfato tricálcico se evaluó de forma cualitativa a cada uno de los aislados puros obtenidos. Para ello se prepararon preinóculos de cada aislado en caldo R2A incubándolos a 15°C por 48 horas. Seguidamente 10 µL de la suspensión celular se inocularon en placas de medio NBRIP agarizado (Anexo 1) (Nautiyal, 1999), el cual contenía fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ como única fuente de fósforo. Las placas se incubaron a 15 °C por siete días; la formación de un halo de disolución por cada una de las colonias fue el criterio para seleccionar los aislados con actividad DFM*. Se utilizaron como controles positivos *Pseudomonas brenneri* (PVG 094) y *Pseudomonas orientalis* (PVG 045).

5. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS AISLADOS OBTENIDOS EN LAS CUMBRES MO6 Y PI2

5.1 Morfología de la colonia

Las Colonias aisladas fueron clasificados en morfotipos específicos, basándose en diferencias visuales, tales como superficie, borde, forma, textura, elevación, consistencia, opacidad y pigmentación (Smibert y Krieg, 1994).

5.2 Morfología de la célula

Como parte de la caracterización morfológica de las células se utilizó la técnica del KOH y se comprobó la naturaleza de Gram mediante tinción. Se utilizó como control Gram Negativo *Escherichia coli* K-12 y como Gram Positivo *Bacillus subtilis* ATCC6633.

La técnica del KOH consiste en tomar una colonia del aislado (Cultivado en agar PD e incubado a 15°C por 48 horas) con el asa de metal estéril, expandirla sobre un porta objeto que contiene 20 µl de solución de KOH al 3% y mezclarla constantemente en una superficie de 1 cm de diámetro. Si la mezcla colonia-KOH se torna notablemente viscosa o gelificada y permite la formación de un “hilo” al elevar el asa sobre la superficie del porta objeto dentro de 30 a 60 segundos, la reacción se consideró positiva, por tanto el aislado es Gram Negativo, por el contrario, si no se observa cambio en la mezcla, esta se consideraba negativa, en este caso el aislado es Gram positivo (Buck, 1982).

Prueba de Gram se utilizó para diferenciar los aislados seleccionados entre Gram Negativos y Gram Positivos. Para ello, luego de 48 horas de incubación a 15°C en medio agar Papa dextrosa, se toma una colonia de cada uno de los aislados y se coloca sobre un portaobjetos para luego fijarla pasando el portaobjeto 2 o 3 veces por la llama, evitando un calentamiento excesivo. Luego se colocará Cristal violeta sobre la muestra por un minuto, para posteriormente lavarla con agua. Posteriormente, se coloca Lugol por un minuto, y se lava con agua, para luego cubrir la placa con alcohol-acetona durante 15 segundos. Después de lavarlo nuevamente, se le colocará Safranina por 45 segundos, se lava para eliminar el exceso de este colorante y se deja secar al aire libre. Las muestras se observaron en un microscopio con un objetivo de 100X.

6. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LOS AISLADOS OBTENIDOS EN LAS CUMBRES MO6 Y PI2

6.1 Determinación cualitativa del crecimiento a diferentes temperaturas

Para la evaluación cualitativa del crecimiento se prepararon preinóculos de cada aislado puro en medio papa dextrosa agarizado incubándolos a 15°C durante 2 días. Cada aislado fue sembrado por rayado en placas de medio papa dextrosa agarizado y se incubaron a 10, 20, 30 y 37 °C, registrando el crecimiento en cada una de las temperaturas ensayadas mediante la observación visual durante siete días.

6.2 Cinética de crecimiento

Para evaluar las cinéticas de crecimiento se prepararon preinóculos de cada aislado en medio R2A líquido y se incubaron a 15°C durante dos días. Luego 50 µl de preinóculo se inocularon en 250 µl de medio R2A líquido en placas de microtitulación estériles, por triplicado y se incubaron a 10, 20 y 30 °C, Posteriormente el crecimiento celular fue seguido midiendo la densidad óptica (D.O) a 630nm en un elisómetro, en intervalos de 4 horas, usando como blanco el tubo correspondiente al control negativo (solo medio R2A). Para evidenciar la cinética de crecimiento se promediaron las tres medidas correspondientes para cada intervalo medido; con estos datos se calcularon las tasas de crecimiento y el valor de la biomasa se estima con el valor máximo de D.O. obtenido para cada una de las temperaturas evaluadas.

Las tasas de crecimiento se calcularon con la siguiente ecuación (Widdel, 2007)

$$\mu = \frac{2,303 \times (\lg D.O.2 - \lg D.O.1)}{(t_2 - t_1)}$$

Siendo D.O.2 (Final) y D.O.1 (Inicial) valores de D.O a 630nm obtenidos durante la fase de crecimiento exponencial.

7. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS AISLADOS OBTENIDOS EN LAS CUMBRES MO6 Y PI2

7.1 Resistencia y tolerancia de los aislados a crecer en varias concentraciones de antibióticos y metales pesados

Se evaluó la resistencia de los aislados seleccionados a distintos antibióticos en medio LB a 15 °C. Para ello, se emplearon siete antibióticos diferentes a dos concentraciones cada uno: Ampicilina (20 y 100 µg/mL), Tetraciclina (20 y 100 µg/mL), Penicilina (20 y 100 µg/mL), Estreptomicina (25 y 100 µg/mL), ácido nalidíxico (25 y 100 µg/mL), *Cloranfenicol* (25 y 100 µg/mL), y Kanamicina (25 y 150 µg/mL).

A los aislados se les determinó su capacidad de crecer en medio LB suplementado con los metales pesados: níquel (NiSO₄), cobre (CuSO₄), cromo (CrCl₃·6H₂O), cobalto (Co(NO₃)₂·6H₂O) y zinc (ZnCl₂), a concentraciones de 50, 100 y 200 ppm incubados a 15°C.

Para ambos ensayos de resistencia a antibióticos y tolerancia a metales se realizó una inspección visual para verificar cualitativamente las diferencias de crecimiento en cada caso. Utilizando como control de crecimiento positivo el aislado Utilizando como control positivo el aislado PVG 246.

7.2 Tolerancia de los aislados a crecer en diferentes concentraciones de NaCl

La tolerancia de los aislados de crecer en presencia de NaCl se verificó sembrando por rayado los aislados en placas de medio LB suplementado con 5, 10, 15 y 20 % de NaCl, incubadas a 15 °C. La tolerancia a las diferentes concentraciones de NaCl fue determinada cualitativamente por inspección visual de las placas al finalizar el período de incubación (5 Días).

7.3 Producción y actividad de enzimas activas a bajas temperaturas

Se determinó la capacidad de los aislados de producir algunas enzimas de interés biotecnológico, activas a bajas temperaturas. Para las pruebas de Amilasas, Proteasas y Catalasas se partió de cultivos crecidos en medio en R2A líquido incubados a 15°C durante dos días.

Amilasas: Se incubaron 10 µL de una suspensión celular de los aislados en medio PD suplementado con 2,5 g/L de almidón (Anexo 1); luego de un período de incubación de 72 horas a 15 °C la superficie de las placas se cubrirán con 3 mL de una solución de lugol el cual al reaccionar con el almidón intacto, forma un complejo púrpura. En las zonas que rodean los aislados que excretan amilasas se forma un halo que puede distinguirse fácilmente debido al contraste con el color púrpura del resto de la placa. Se emplea como control positivo *Pseudomonas brenneri* (PVG 094).

Proteasas: Se inocularon 10 µL de una suspensión celular de los aislados en agar leche (Anexo 1); luego de un período de incubación de 72 horas a 15 °C, la presencia de esta enzima se observa por la formación de un halo en la zona que rodea los aislados producto de la degradación de la caseína presente en el medio. Se utiliza como controles positivo *Janthinobacterium lividum* (PVG 088) y PVG061.

β-galactosidasa: Los aislados se sembraron con asa estéril en placas de agar Papa dextrosa suplementado con 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal) partiendo de una solución de 20 mg/mL (40 µL por 25 ml de PD). Las placas se incubaron a 15 °C por 72 horas. El X-gal es un sustrato cromogénico similar a la galactosa, que al ser degradado por la enzima en cuestión se torna de color azul, por lo tanto la aparición de un color azul en los aislados indica la producción de la enzima β-galactosidasa. Se usaron como control positivo para el ensayo *Escherichia coli* XL1-Blue; PVG 040.

Catalasas: Se evaluó inoculando cada aislado en placas de medio PD y luego de un período de incubación de 48 horas a 15 °C, se agregó sobre las colonias 100 µL de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 20%. Un resultado positivo para la prueba se observó mediante la efervescencia.

Prueba de Oxidasa: Se evaluó utilizando tiras de papel de filtro N°1 impregnadas con solución de reactivo 1% Tetrametil (Reactivo de Kovacs), secadas a 37°C por 30 min y posteriormente guardadas en un envase color ámbar a temperatura ambiente. El procedimiento consistió en tomar directamente con un palillo estéril de madera una muestra bacteriana a partir de una colonia aislada proveniente de un cultivo de 48h en medio agar nutritivo (anexo 1); cada una de las muestras se pone en contacto con la tira y en el transcurso de un minuto la aparición de un color azul-violeta indica que la prueba fue positiva. La ausencia de viraje evidente al transcurrir 30 segundos indica que la prueba es negativa. Se usaron como control positivo *Pseudomonas aeruginosa* ATCC y como **control negativo** *Escherichia coli* ATCC 25922.

7.4 Capacidad de los aislados de fermentar la lactosa

Los aislados provenientes de medio agar nutritivo se sembraron con asa estéril en placas con medio agar McConkey con la finalidad de separar las bacterias fermentadoras de lactosa de aquellas que no la fermentan. El medio contiene lactosa, único carbohidrato y rojo neutro como indicador de

pH, cuyo ámbito de viraje está entre pH 8,0 (amarillo) y pH 6,8 (rojo). Aquellas bacterias que son fermentadoras de lactosa producen colonias que varían en el tono rojo: rojas, fucsia o incoloras con el centro rosado, y las no fermentadoras de lactosa producen colonias incoloras y el medio adquiere un ligero tono amarillo, pues las bacterias utilizan las peptonas y alcalinizan el medio de cultivo. Se utilizó como control positivo *Escherichia coli* ATCC 25922 y control negativo *Proteus vulgaris* ATCC 13315.

7.5 Pruebas bioquímicas para la identificación de Enterobacterias

Las bacterias lactosa positiva provenientes del agar McConkey se inoculan en un caldo nutritivo Tioglicolato (Anexo 2) durante un día a 15 °C, luego se agregaron 100 µL de preinóculo en cada uno de los tubos de ensayo por punción o estría. La incubación de los tubos es en aerobiosis a 15 °C durante siete días.

La batería bioquímica para la identificación de Enterobacterias está conformada por los siguientes tubos: Fenilalanina, Indol, Lisina, Ornitina, Motilidad, Lactosa, Citrato, Kligler y Urea.

La producción de Fenilalanina (PPA) deaminasa se evaluó en el tubo 1 (Anexo 2). La PPA es un aminoácido que puede ser deaminado de forma oxidativa por algunas bacterias debido a su capacidad para producir la enzima fenilalanina desaminasa con producción de un cetoácido llamado ácido fenilpirúvico, el cual se detecta al añadir una solución de cloruro férrico (FeCl_3) al 10% desarrollándose un color verde por la quelación entre ambos compuestos, lo que indica una reacción positiva, mientras que si el microorganismo no es capaz de desaminar el aminoácido el FeCl_3 permanece de su color original (amarillo ocre). Usando como Control Positivo *Proteus vulgaris* ATCC 13315 y como control negativo *Escherichia coli* ATCC 25922.

En el tubo 2 (Anexo 2) se apreció la producción de Indol dependiente de la presencia de un grupo triptófano en el medio. El indol se forma por acción de la enzima triptofanasa y reacciona con el aldehído del reactivo de Kovacs para formar un anillo color fucsia. Usando como Control Positivo *Escherichia coli* ATCC 25922 y como control negativo *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.

La prueba de fermentación de hidratos de carbono se observó analizando el tubo 3 Glucosa y el tubo 7 Lactosa (Anexo 2), que contenían como medio base rojo de fenol, un solo carbohidrato y un tubo Durham. Si el microorganismo tiene la capacidad de fermentar los carbohidratos se forman ácidos mixtos que disminuyen el pH del medio provocando un viraje del indicador rojo de fenol de un color naranja rojizo (pH neutro) a amarillo (pH ácido). Si además se produce gas, este desplazará el líquido en el tubo de Durham y observaremos una burbuja. Si el microorganismo no utiliza el carbohidrato presente en el medio, solo degrada las peptonas a aminos alcalinizando el medio por lo cual el indicador vira a fucsia es negativo. Usando como Control Positivo *Escherichia coli* ATCC 25922 (Amarillo + Gas) y como Control Negativo *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750.

En los tubos 4 Lisina y 5 Ornitina (Anexo 2) se apreció la descarboxilación y desaminación de aminoácidos. La lisina y Ornitina son enzimas adaptativas o inducidas, debido a que solo se forman cuando un microorganismo es cultivado en un ambiente ácido en presencia de un sustrato específico, y los productos de descarboxilación cambian el pH a límites alcalinos. La degradación de los aminoácidos ocurre en anaerobiosis, la descarboxilación es irreversible y no oxidativa.

Los aminoácidos (tubos 4 y 5 Anexo 2) se evaluaron en caldo Möller que contenía el indicador de pH purpura de bromocresol (amarillo-verdoso a pH ácido y purpura a pH alcalino), glucosa y peptona. El aminoácido a evaluar se añade al medio base antes de inocular la bacteria. Debe disponerse de un tubo control que consiste en el medio base sin el aminoácido (LOA tubo 33). Ambos tubos se incuban en anaerobiosis (cubiertos con una capa de parafina líquida) luego si la bacteria tiene la enzima el aminoácido será descarboxilado alcalinizando el medio y como consecuencia habrá viraje del indicador a púrpura.

En el agar Motilidad (tubo 6) (Anexo 2) se observará si los microorganismos mostraban un crecimiento difuso o turbidez en el agar a lo largo de la línea de inoculación. Los organismos inmóviles crecían solo a lo largo de la línea de inoculación.

En el tubo 8 se utiliza el Citrato de Simmons (Anexo 2), que contiene citrato de sodio como única fuente de carbono y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno. Las bacterias que pueden utilizar el citrato pueden también utilizar el amonio como única fuente de nitrógeno, lo que resulta en la producción de amoníaco (NH_3^+) y la alcalinización del medio debido a la conversión del NH_3^+ en hidróxido de amonio (NH_4OH), produciéndose un viraje del indicador azul de bromotimol de verde a azul, lo que indica una reacción positiva; si el microorganismo no utiliza el citrato no se produce cambio en el color del medio, es decir, permanece verde. Usando como Control Positivo *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 y como control negativo *Escherichia coli* ATCC 11752.

Los microorganismos que pueden hidrolizar la Urea liberando amoníaco reaccionan con la solución para formar carbonato de amonio, resultando en la alcalinización y aumento el pH del medio.

Esta reacción es detectada en el tubo 22 por el indicador rojo de fenol el cual es de color fucsia a pH alcalino. Se utilizó el medio de agar urea de Christensen (Anexo 2) para la detección de la actividad ureasa. Este medio sólido inclinado, es inoculado por estrías, el color fucsia a través del medio indica la alcalinización del mismo y por consiguiente la hidrólisis de urea, cuando no hay hidrólisis el medio permanece en su color original amarillo.

El Kligler (KIA) (tubo 47 Anexo 2) es un medio diferencial en tubo que cumple un doble propósito: 1) la determinación de la fermentación de hidratos de carbono (glucosa y lactosa) y 2) la determinación de la producción de H₂S. El medio es envasado en tubos con agar inclinado lo cual le confiere dos cámaras de reacción en un mismo tubo: la cámara superior cuña o bisel y cámara inferior o taco. La cuña es aeróbica, pues su superficie está expuesta al oxígeno atmosférico, mientras que el taco es buena medida anaeróbico ya que no está en contacto con el aire. En esta porción se lee la fermentación de la glucosa mientras que en el bisel o cuña se lee la fermentación de la lactosa

La interpretación del KIA se muestra (Tabla 1, anexo 2) en forma estándar primero el bisel, luego el taco, separado por una barra, finalmente la producción de Gas y H₂S. Usando como Control *Escherichia coli* ATCC 25922 (A/A + -), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (K/K - -).

8. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE ADN PLASMÍDICO

Para comprobar la presencia de plásmidos se emplearon los métodos de lisis alcalina modificada descritos por Kotchoni (2003) y la utilización del sistema de purificación minipreps (kit wizard minipreps Promega), en cada una de ellas se partió de un cultivo crecido en caldo R2A incubados a 15°C durante dos días.

LISIS ALCALINA (Kotchoni y col., 2003): 1,5 mL de una suspensión bacteriana se centrifugan a 12.000 rpm por 5 min, el sobrenadante es descartado y el pellet resuspendido en 200 µL de solución I (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0 y 4 µg/ml lisozima). La suspensión se incubada a temperatura ambiente por 5 min. Luego se añaden 400 µL de solución II (0.2 M NaOH, 1 % (p/v) SDS) y la suspensión se mezclará suavemente por inversión 4 a 6 veces; inmediatamente se deben agregar 200 µL de solución III [8 M acetato de amonio (CH₃COONH₄)], se mezcla suavemente con ayuda de una pipeta y el tubo se incuba a 4 °C por 5 min. Luego del período de incubación la suspensión se centrifugada a 12.000 rpm por 5 min y el sobrenadante cuidadosamente será transferido a un tubo Eppendorf nuevo. Se agregan 0,6 V de isopropanol y se mezcla suavemente 4 a 6 veces por inversión, la mezcla se mantiene a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente se centrifuga a 12.000 rpm por 5 min, el sobrenadante es descartado y el pellet resuspendido en 400 µL de etanol al 70 %; inmediatamente la mezcla se centrifugada a 12.000 rpm por 3 min, el sobrenadante se descarta y el pellet es incubado a temperatura ambiente para eliminar los residuos de etanol. Finalmente el pellet se resuspende en 30 µL de agua destilada estéril y estará almacenado a -20 °C.

El ADN plasmídico extraído fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las bandas correspondientes a los plásmidos se visualizaron en un transiluminador UV después de la tinción con bromuro de etidio de los geles.

9. DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE FITOPATÓGENOS

Se realizó inoculando 20 µL de una suspensión bacteriana de cada uno de los aislados en estudio en placas de medio agar malta; éstas fueron incubadas a 15 °C por 48 horas. Posteriormente, un cuadrado de medio agar malta que contenía el micelio de *Pythium ultimum* fue colocado en el centro de las placas, e incubado a 25 °C. Luego del período de incubación de cinco días, se realizó una inspección visual de las placas. La ausencia de crecimiento en el área de confluencia de *P. ultimum* con los aislados en estudio indicaron la presencia de componentes inhibitorios. Se utilizó como control positivo la cepa CHA0 de *Pseudomonas fluorescens*.

10. PARÁMETROS AMBIENTALES A MEDIR EN EL SITIO DE MUESTREO

10.1 Determinación del contenido de materia orgánica del suelo por el método de pérdida por ignición

Para las dos cimas en estudio PI2 y MO6 se colectaron muestras de suelo fuera de las parcelas de la red GLORIA Andes (Figura 6) en cada orientación (Norte, Sur, Este y Oeste) para un total de 16 muestras por cumbre. Para tomar las muestras de suelo primero se descartó la hojarasca y el material orgánico más superficial, con ayuda de una pala se colectaron las muestras de suelo entre 5 y 10 cm de profundidad, almacenándolas en bolsas de cierre clip previamente identificadas para determinar el porcentaje de materia orgánica del suelo (MOS).

Se determinó el contenido de MOS a través de la diferencia de peso entre una muestra de suelo seca y el peso de las cenizas después de incinerar las muestras por el método de pérdida por ignición (LOI) (Schumacher, 2002).



Figura 6. Esquema de una parcela de monitoreo GLORIA Andes, especificando con triángulos negros los puntos donde se realizó la colecta de muestras de suelo para la determinación del contenido de materia orgánica.

Indica el lugar donde se tomaron las muestras

Para esto, primero se pesaron en una *balanza analítica* los crisoles previamente identificados y luego se pesaron 2 g de suelo. Los crisoles con las muestras de suelo fueron secados en la estufa a una temperatura de 105 °C, durante 3 horas. Luego de secados se dejaron enfriar en una desecador y se pesaron (Crisol+ muestra seca). Finalmente, se calcinaron las muestras en una mufla a 400°C por un lapso de 4 horas, se dejaron enfriar en una desecadora, y se pesaron a temperatura ambiente (Crisol+ Muestra Calcinada). El contenido de materia orgánica se calculó con la siguiente fórmula.

$$\frac{[(\text{Crisol} + \text{muestra seca}) - (\text{Crisol} + \text{Muestra Calcinada})]}{[(\text{Crisol} + \text{muestra seca}) - \text{Crisol}]} \times 100$$

Para las cuatro réplicas de muestras de suelo colectadas por orientación, se analizaron dos replicas analíticas correspondientes a cada una de las orientaciones de origen, teniendo un total de 8 muestras analíticas analizadas para cada una de las orientaciones en las dos cumbres en estudio PI2 y MO6. Los datos de materia orgánica en suelo fueron organizados en una matriz y se estimaron los promedios y desviaciones estándar de cada variable en cada situación definida.

10.2 Recolección de datos de temperatura

En cada una de las parcelas monitoreadas a largo plazo por la red GLORIA-Andes se localizan cuatro sensores Onset TidBit v2, ubicados en la cuadrícula 2.2, en la parte central de la parcela de 3x3 m (figura 7), enterrados a 10 cm de profundidad del suelo; dichos sensores de temperatura tienen un rango de temperatura que va desde -20°C hasta +70°C, con una precisión de 0,2°C por encima de 0° to 50°C, contando con una resolución de 0,02°C, registrando 24 mediciones por día, es decir, un registro cada hora (Pauli y col., 2015).

Para descargar los datos de temperatura de las dos cumbres en estudio PI2 y MO6, el registrador Onset TidBit v2 requiere hardware de conexión al ordenador a través de un lector óptico y USB, por lo tanto tiene que ser desenterrado cada vez que se quieren descargar los datos (Pauli y col., 2015). Posteriormente los datos de temperatura se ordenaron en una matriz y se calcularon las mínimas, máximas absolutas y promedios diarios. Para analizar los resultados se realizó un gráfico donde se muestra el comportamiento durante un año Agosto 2016 - Agosto 2017.

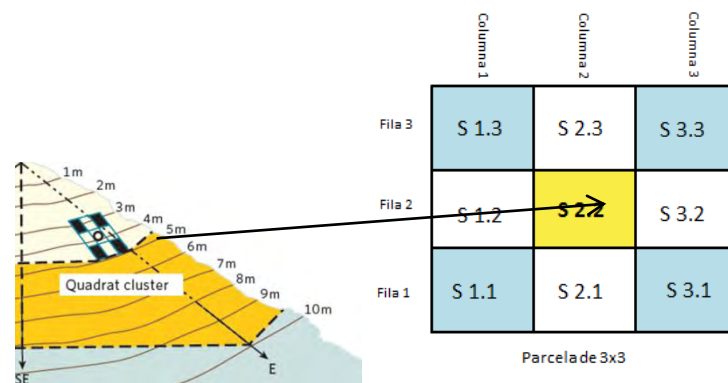


Figura 7. Modelo de referencia para explicar la ubicación del sensor Onset TidBiT v2 en la cuadrícula 2.2 de una parcela de la red GLORIA-Andes Venezuela.

RESULTADOS

3. AISLAMIENTO Y OBTENCIÓN DE MICROORGANISMOS EN LAS CUMBRES MO6 Y PI2

La técnica de aislamiento primario empleada permitió obtener 186 morfotipos bacterianos cultivables, para la cumbre PI2 se obtuvieron 137 aislados y para la cumbre MO6 49 aislados.

Partiendo de estos aislados obtenidos se procedió a estudiar su morfología, notándose que se logró un mayor número de morfotipos bacterianos en las muestras sembradas en los medios agarizados R2A, LB y Malta (figura 8).

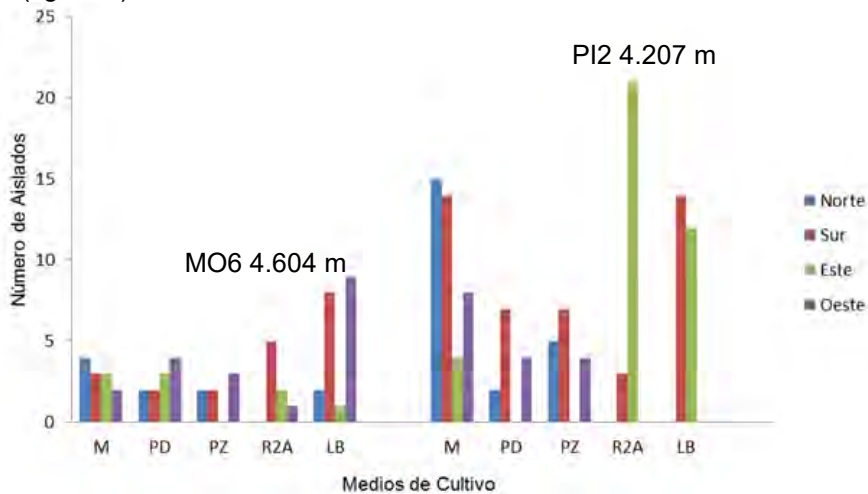


Figura 8. Número de Morfotipos bacterianos obtenidos por orientación en el aislamiento primario en cinco medios agarizados para las cumbres PI2 y MO6

*Las barras de colores hacen referencia a la orientación, Norte (azul), Sur (rojo), Este (verde), Oeste (morado)

* Medios Agarizados, agar Malta (M), Papa Dextrosa (PD), Papa Zanahoria (PZ), Luria Bertani (LB), R2A; d

Con la finalidad de reducir el número de aislados a analizar, se seleccionaron morfotipos según los siguientes criterios (figura 9).

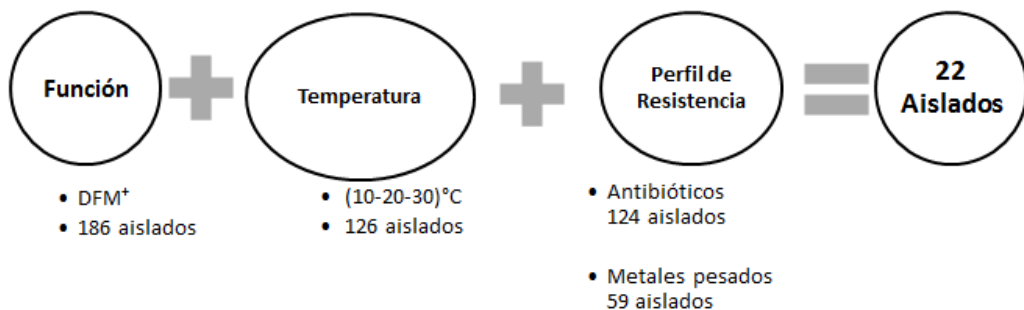


Figura 9. Aislados seleccionados de acuerdo a los criterios establecidos

Basados en estos 3 criterios estudiados se seleccionaron veintidós aislados (tabla 1) que manifiestan perfiles de identidad de resistencia únicos, lo que garantiza que cada uno de los aislados seleccionados sean distintos, la selección de estos aislados facilitó su manipulación y aislamiento para continuar con su caracterización en ensayos posteriores.

Tabla 1. Aislados seleccionados en este trabajo

PVG628	PVG637	PVG655	PVG663	PVG694	PVG718	PVG735	PVG748
PVG631	PVG640	PVG660	PVG692	PVG695	PVG721	PVG742	
PVG633	PVG650	PVG661	PVG693	PVG711	PVG729	PVG745	

Tabla 2. Resumen del número total de aislados evaluados en cada una de las pruebas ensayadas

Fenotipo DFM+	Rango de crecimiento	Resist Antib	Toler Metales	Inhibición <i>P.ultimum</i>	cinética de crecimiento	Caracterización Morfológica	Enzimas activas a bajas T	batería bioquímica	Perfil plasmídico
186	126	122	59	22	22	22	22	7	22

4. CAPACIDAD DE DISOLUCIÓN DE FOSFATOS DETERMINADA EN MEDIO NBRIP SÓLIDO

Mediante este método fue posible detectar que de los 186 aislados evaluados, 72 de ellos presentan actividad DFM⁺ a 15 °C. Los morfotipos bacterianos con actividad DFM⁺ representan un 38,77% para la cumbre PI2 y un 40,81% en MO6. En la tabla 3 se muestran los aislados bacterianos con actividad DFM⁺, 52 corresponden a los aislados de la cumbre PI2 y 19 a la cumbre MO6. La capacidad de disolución de fosfatos de los aislados fue determinada tomando en cuenta la formación de un halo de disolución; este se muestra en la figura 10 donde los aislados PVG692, PVG723, PVG727, PVG742, PVG744, PVG746 presentan actividad DFM⁺ a 15 °C.

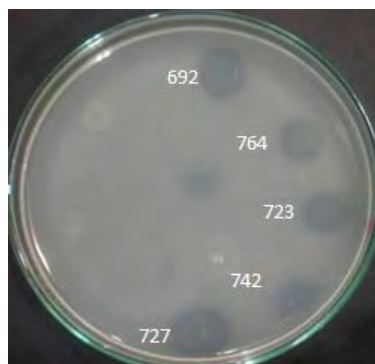


Figura 10. Disolución de fosfato tricálcico en medio NBRIP sólido por parte de los aislados incubados a 15 °C

Tabla 3. Aislados de la cumbre MO6 con Actividad de Disolución de fosfato tricálcico en medio NBRIP sólido

Origen	Aislado	Origen	Aislado	Origen	Aislado
M06 Norte	PVG 625	M06 Oeste	PVG 636	M06 Sur	PVG 663
	PVG 627		PVG 637		PVG 664
	PVG 628		PVG 639		PVG 666
	PVG 629		PVG647		PVG 667
	PVG631		PVG 648		PVG 668
	PVG 632				PVG 670
	PVG 633				PVG 671

Tabla 4. Aislados de la cumbre PI2 con Actividad de Disolución de fosfato tricálcico en medio NBRIP sólido

Origen	Aislado	Origen	Aislado	Origen	Aislado
PI2 Sur	PVG 692	PI2 Norte	PVG 776	PI2 Este	PVG 810
	PVG 693		PVG 711		PVG 789
	PVG 694		PVG 712		PVG 794
	PVG 695		PVG 714		PVG 804
	PVG 701		PVG 718		PVG 790
	PVG 764		PVG 721		PVG791
	PVG 762		PVG 723		PVG 742
	PVG 761		PVG 765		PVG 744
	PVG 684		PVG 742		PVG 745
	PVG 759	PI2 Este	PVG 744		PVG 746
	PVG 755		PVG 745		PVG 797
	PVG 695		PVG 800		
	PVG 727		PVG 746		PVG 808

	PVG 729		PVG 807		PVG 809
	PVG 730		PVG 813		
	PVG 733		PVG 748		
	PVG 778		PVG 749		
	PVG 777		PVG 751		
	PVG 735		PVG784		
	PVG 773		PVG 795		
	PVG 779		PVG 793		
			PVG 799		

5. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS AISLADOS OBTENIDOS EN LAS CUMBRES MO6 Y PI2

Los aislados seleccionados fueron clasificados en morfotipos específicos basándose en las diferencias visuales de las características distintivas de la colonia de cada aislado. Las superficies observadas (Tabla 5) fueron Convexa (Cx), Acuminada (Ac), Plana (PI) y Planoconvexa (Plcx); se diferencian dos tipos de opacidad, la opaca (Op) y la traslúcida (Tras); los bordes más frecuentes fueron el entero (En) y redondeando, presentándose con menor frecuencia el espiculado (Ep) y ondulado (O); se observaron dos tipos de textura Brillante (B) y mate (M), en cuanto a la forma la más frecuente fue circular (Cir) pero también se observó puntiforme (Pt), la rizoide (Rz) y la irregular (Irrg); Ocho de veintidós aislados tienen una consistencia mucoide (Muco); diez aislados presentan una consistencia cremosa (Crem) y cuatro de los aislados son de consistencia seca (seca); siete de los veintidós aislados evaluados exhibieron pigmentación amarilla (Am), también se destacaron las pigmentaciones blancas y beige. La visualización a través del microscopio de luz, mostró bacterias predominantemente en forma de bacilos y en menor proporción en forma de cocobacilos, la prueba de Gram reveló que los veintidós aislados son gram negativos (Figura 11).

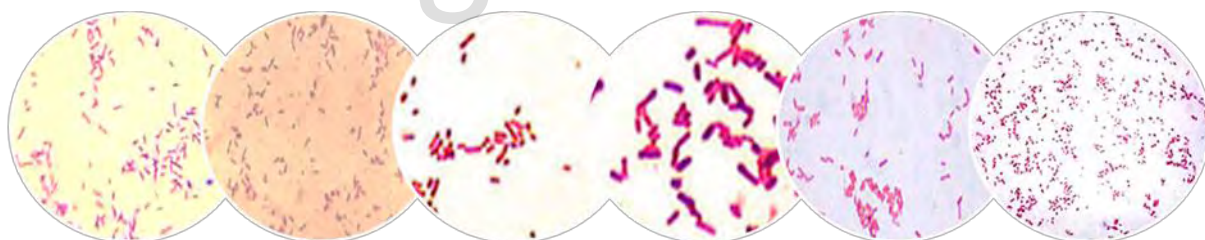


Figura 11. Morfología de los aislados gram negativos observada en el microscopio de luz (Objetivo 100X)

Tabla 5. Caracterización Morfológica de los veintidós aislados bacterianos seleccionados

Aislado	Procedencia y orientación	Medio de cultivo en el que se aislaron por primera vez	Morfología de la Colonia							Morfología de la Célula
			Superficie	Textura	Borde	Forma	Consistencia	Opacidad	Pigmentación	
PVG628	M06,Norte	PZ	Cx	B	R	Cir	Muco	Op	Am	Bacilos
PVG631	M06,Norte	PD	Cx	M	R	Cir	Crem	Tras	Crema	Bacilos
PVG633	M06,Norte	LB	Ac	M	R	Cir	Crem	Op	Blanca	Cocobacilos
PVG637	M06,Oeste	LB	PI	M	R	Pt	Crem	Tras	Am	Cocobacilos
PVG640	M06,Oeste	LB	Cx	M	R	Cir	Crem	Tras	Am	Cocobacilos
PVG650	M06,Este	LB	PI	M	R	Cir	Crem	Tras	Am	Cocobacilos
PVG655	M06,Este	M	Cx	B	R	Cir	Seca	Tras	Tras	Cocobacilos
PVG660	M06,Este	R2A	Ac	B	R	Cir	Muco	Tras	Blanca	Cocobacilos
PVG661	M06,Sur	M	PI	M	R	Cir	Crem	Tras	Am	Cocobacilos
PVG663	M06,Sur	R2A	Plcx	M	Ep	Riz	Seca	Op	Am	Bacilos
PVG692	PI2,Sur	AM	PI	B	En	Cir	Crem	Tras	Crema	Bacilos
PVG693	PI2,Sur	AM	PI	B	En	Cir	Crem	Tras	Crema	Bacilos
PVG694	PI2,Sur	AM	Cx	B	En	Cir	Crem	Tras	Crema	Bacilos
PVG695	PI2,Sur	AM	Cx	B	En	Cir	Muco	Tras	Blanca	Bacilos
PVG711	PI2,Norte	PD	PI	B	En	Cir	Crem	Tras	Tras	Bacilos
PVG718	PI2,Norte	PD	Cx	B	En	Cir	Muco	Op	Am	Bacilos
PVG721	PI2,Norte	PD	Cx	B	En	Cir	Muco	Tras	Tras	Bacilos
PVG729	PI2,Oeste	PD	PI	B	En	Cir	Muco	Tras	Tras	Bacilos
PVG735	PI2,Oeste	PD	Cox	M	En	Cir	Muco	Tras	Blanca	Bacilos
PVG742	PI2,Este	PD	PI	B	En	Cir	Seca	Tras	Tras	Bacilos
PVG745	PI2,Este	PD	Cx	M	O	Irrg	Muco	Tras	Beige	Bacilos
PVG748	PI2,Este	R2A	Cx	B	En	Cir	Seca	Tras	Tras	Bacilos

6. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LOS AISLADOS OBTENIDOS EN LAS CUMBRES MO6 Y PI2

6.1 Determinación cualitativa del crecimiento a diferentes temperaturas

La determinación cualitativa de crecimiento a diferentes temperaturas permitió estimar que el rango de crecimiento de los aislados se encuentra entre 10 y 30°C (anexo 3), ninguno de los aislados fue capaz de crecer a 37 °C.

6.2 Determinación de la cinética de crecimiento para los aislados seleccionados

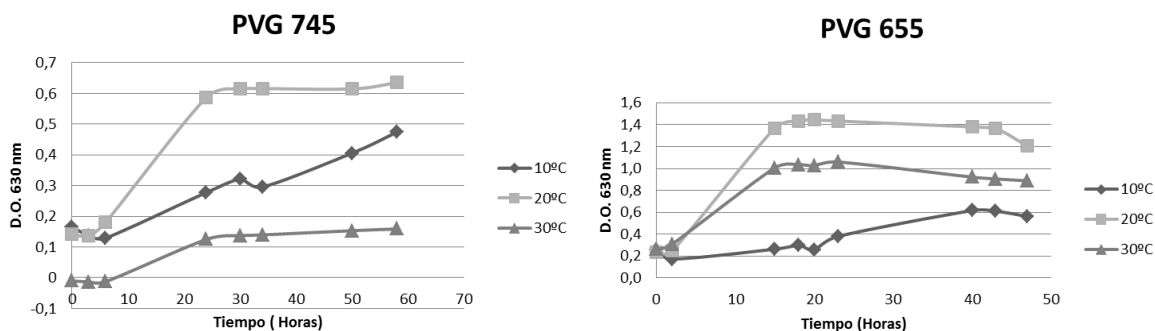
Una vez evaluada de forma cualitativa la capacidad de los aislados de crecer a diferentes temperaturas se procedió a cuantificar ese crecimiento, para ello fueron seleccionados los 22 aislados escogidos bajo los tres criterios explicados anteriormente con la finalidad de determinar la naturaleza psicrófila o psicrotolerante de los aislados.

Los valores estimados de la tasa de crecimiento (μ ; Anexo 5) permitieron agrupar los aislados en tres categorías (Tabla 6); Grupo I: Aislados con tasa de crecimiento en el orden 20°C > 10°C > 30°C; Grupo II: Aislados con tasa de crecimiento en el orden 20°C > 30°C > 10°C, Grupo III: Aislados con tasa de crecimiento en el orden 30°C > 20°C > 10°C. Las curvas de crecimiento obtenidas para los aislados PVG745, PVG693 y PVG655 (Figura 12) se utilizan como graficas modelo para representar las 3 categorías estimadas; el Grupo I representado por el aislado PVG745, el Grupo II por el aislado PVG655, y el Grupo III por el aislado PVG718.

Tabla 6. Grupos de crecimiento para los aislados bacterianos según su tasa de crecimiento μ a diferentes temperaturas

Grupo I	Grupo II	Grupo III
PVG 628	PVG 748	PVG 729
PVG 660	PVG 650	PVG 718
PVG 745	PVG 655	PVG 742
	PVG 661	PVG 693
	PVG 663	PVG 694
	PVG 655	PVG 695
	PVG 633	PVG 711
	PVG 637	PVG 721
	PVG 640	PVG 735
	PVG 631	

*GI : μ 20 °C > 10 °C > 30 °C GII: μ 20 °C > 30 °C > 10 °C; GIII:



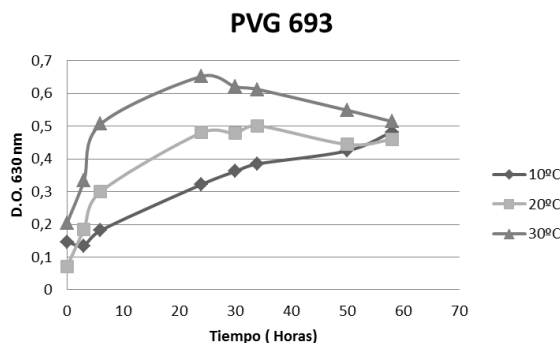


Figura 12. Curvas de crecimiento obtenidas mediante la cinética de crecimiento
 * Las temperaturas a las cuales se midió la D.O a 630 nm están representadas por:
 ▲ 30°C, ■ 20°C y ◆ 10°C.

Para estimar el valor de la biomasa se utilizó el valor máximo obtenido de D.O. para cada una de las temperaturas evaluadas (Tabla 7). Los aislados que produjeron mayor biomasa a 20°C comparada con la cantidad de biomasa producida a 30°C, se corresponden con los aislados del Grupo I y II, mientras que los aislados que mostraron mayor producción de biomasa a 30°C se corresponden con los aislados del Grupo III.

Tabla 7. Valores de densidad óptica máxima alcanzada por los 22 aislados bacterianos a diferentes temperaturas

Aislado	D.O. 630 nm			Aislado	D.O. 630 nm		
	10°C	20°C	30°C		10°C	20°C	30°C
PVG633	0,666	1,473	1,039	PVG 693	0,482	0,501	0,652
PVG628	0,635	1,525	0,524	PVG 694	0,45	0,534	0,653
PVG631	0,542	1,441	0,687	PVG 695	0,39	0,536	0,618
PVG637	0,671	1,347	0,853	PVG 711	0,542	0,642	0,895
PVG640	0,676	1,269	0,845	PVG 718	0,424	0,557	0,732
PVG650	0,604	1,226	0,779	PVG 721	0,350	0,591	0,691
PVG655	0,616	1,446	1,060	PVG 729	0,385	0,629	0,628
PVG660	0,565	0,410	0,253	PVG 735	0,527	0,556	0,632
PVG661	0,028	0,857	0,442	PVG 742	0,513	0,615	0,629
PVG663	0,299	0,909	0,767	PVG 745	0,473	0,634	0,158
PVG 692	0,488	0,532	0,703	PVG 748	0,408	0,625	0,486

7. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS AISLADOS OBTENIDOS EN LAS CUMBRES MO6 Y PI2

7.1 Resistencia de los aislados de los aislados bacterianos a diferentes concentraciones de antibióticos

La resistencia evaluada en 122 aislados muestra que, 114 aislados son multiresistentes, observándose que el aislado PVG697 posee resistencia a los 7 antibióticos evaluados. También destaca que los antibióticos tetraciclina y ácido nalidíxico tuvieron mayor efecto sobre la inhibición del crecimiento, mientras que los otros cinco antibióticos evaluados presentaron un menor efecto sobre el crecimiento de los aislados, siendo resistentes

En la figura 13 se muestra el porcentaje de resistencia que exhiben los aislados a la mayor concentración de antibiótico evaluada, la concentración de 100µg/mL corresponden a: ampicilina (Amp), tetraciclina (Tet), penicilina (Pen), estreptomycin (Str), ácido nalidíxico (Nal) y Kanamicina (Kan) y la concentración de 150 µg/mL a *Cloranfenicol* (Cam).

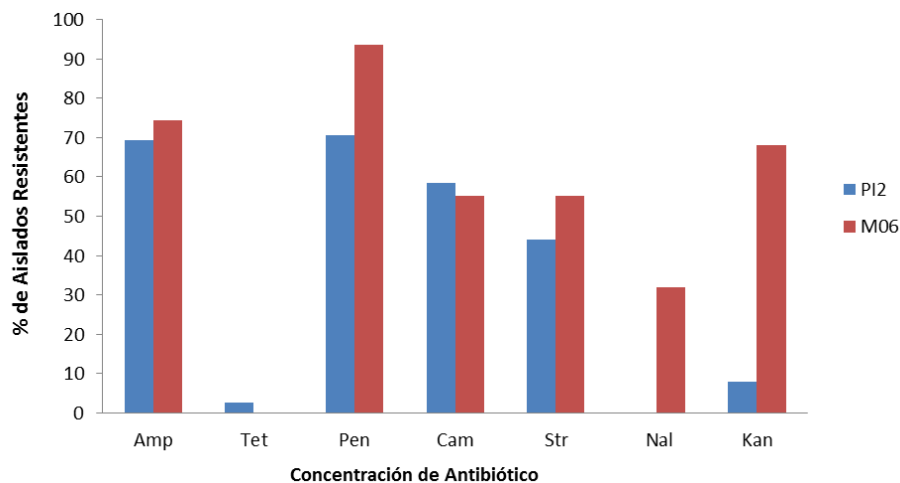


Figura 13. Resistencia a la mayor concentración de antibiótico evaluada en 124 aislados obtenidos en las cumbres MO6 y PI2

*las barras azules corresponden a los aislados de PI2 y las barras rojas a los aislados de MO6

*los valores se muestran en anexo 6

7.1 Tolerancia de los aislados a crecer en diferentes concentraciones de metales pesados

La Tolerancia a cinco metales pesados evaluada en 59 aislados muestra que 4 de los aislados PVG627, PVG629, PVG643, PVG657 son tolerantes a solo uno de los cinco metales pesados evaluados, mientras que 54 aislados resultaron ser *multitolerantes*.

En la figura 14 se muestra el porcentaje de tolerancia que exhiben los aislados a la mayor concentración de diferentes metales pesados evaluada (200 ppm) de níquel (Ni), cobre (Cu), cromo (Cr), cobalto (Co) y zinc (Zn); en ambas cumbres más del 70% de los aislados mostraron resistencia a la concentración de cromo de 200 ppm.

7.2 Tolerancia de los aislados a crecer en varias concentraciones de NaCl

La tolerancia de los aislados de crecer en cuatro concentraciones diferentes 5, 10, 15, 20 % de NaCl fue examinada en 59 aislados; siete aislados (PVG640, PVG692, PVG693, PVG 694, PVG695, PVG711, PVG718) exhibieron tolerancia a 5% de NaCl y solo el aislado PVG640 fue tolerante a 10% de NaCl.

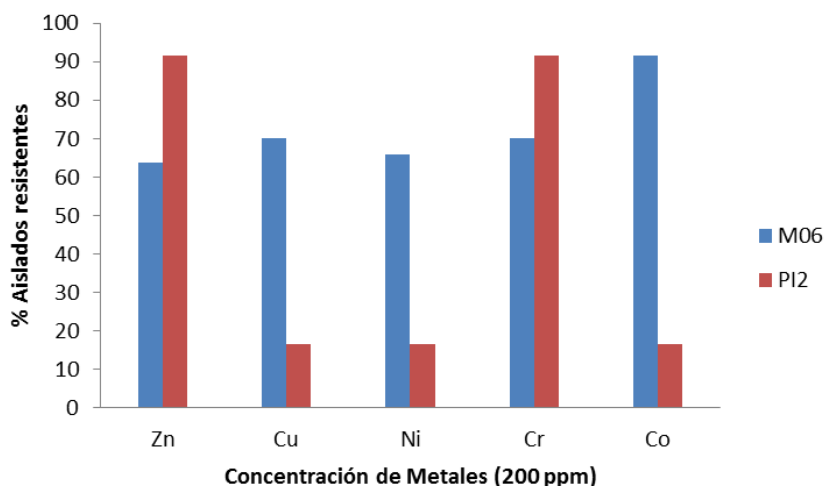


Figura 14. Tolerancia a metales pesados [NiSO₄, CuSO₄, CrCl₃·6H₂O, Co(NO₃)₂·6H₂O y ZnCl₂]

* Las barras azules corresponden a los aislados de MO6 y las barras rojas a los aislados de PI2.

7.3 Producción y actividad de Enzimas activas a bajas temperaturas evaluada en los veintidós aislados seleccionados

Con la finalidad de determinar si los aislados producen enzimas activas a bajas temperaturas, de importancia o interés biotecnológico, se analizó cualitativamente la producción de proteasas, amilasas, catalasas y β -Galactosidasas. Los resultados muestran que los veintidós aislados en estudio son capaces de sintetizar catalasas y poseen actividad citocromo oxidasa; 8/22 producen algún tipo de proteasas, solo uno de los aislados (PVG663) fue capaz de producir la enzima β -galactosidasa y ninguno de ellos produjo algún tipo de amilasa.

Con respecto a la actividad proteasa en la figura 15 se nota que el aislado PVG631 forma un halo en la zona que rodea la colonia como producto de la degradación de la caseína presente en el medio, mostrando así que produjo algún tipo de proteasa. El aislado PVG663 (Superior Derecha) se torna de color azul como indicativo de la producción de la enzima β -galactosidasa en un sustrato X-gal. En la parte inferior izquierda se observa la producción de una efervescencia que muestra que los aislados son capaces de sintetizar la enzima catalasa. Los aislados evaluados muestran actividad citocromo oxidasa, desarrollan un color azul oscuro en el sitio de inoculación (inferior derecha).

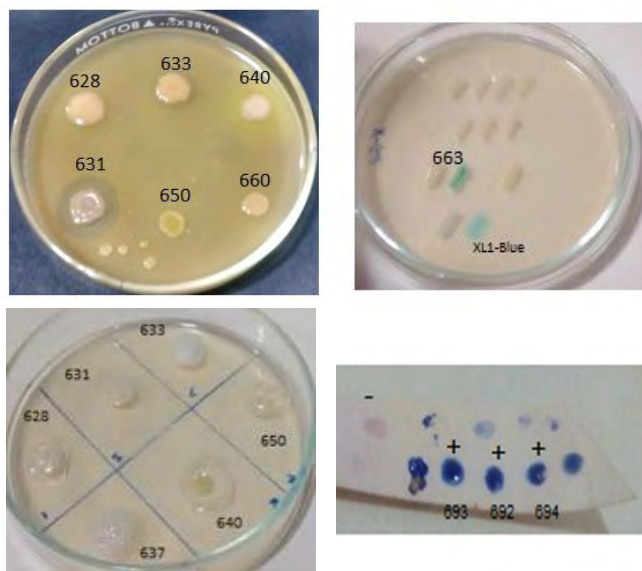


Figura 15. Evaluación de la producción de enzimas activas a bajas temperaturas
*Superior Izquierda actividad Proteasa; Superior Derecha actividad β -galactosidasa; inferior izquierda actividad catalasa.; inferior derecha actividad citocromo oxidasa

7.4 Capacidad de los aislados de fermentar la lactosa

En la tabla 8 se muestran los resultados de catorce aislados a los cuales se les evaluó su crecimiento en medio agar McConkey, las bacterias fermentadoras de lactosa se observaron de color rosado, indicando que pueden formar ácido a partir de lactosa en el medio, mientras que las no fermentadoras de lactosa se observaron incoloras o transparentes.

Tabla 8. Crecimiento en medio agar McConkey

Aislado	Lactosa	Aislado	Lactosa	Aislado	Lactosa	Aislado	Lactosa
PVG 692	-	PVG 628	+	PVG 711	-	PVG 742	-

PVG 693	+	PVG 631	-	PVG 721	+	PVG 748	-
PVG 694	+	PVG 663	-	PVG 729	+	PVG 745	+
PVG 695	+	PVG 655	-	<i>E.coli</i> ATCC 25922	+	<i>P.vulgaris</i> ATCC 13315	-

7.5 Pruebas bioquímicas para la identificación de Enterobacterias

La lectura e interpretación de la batería bioquímica (Tabla 9) para la identificación de las *Enterobacterias* se realizó siguiendo la clasificación elaborada por la oficina editorial del Manual Bergey de Bacteriología Sistemática (Garrity,2005); los resultados obtenidos no fueron concluyentes para lograr la identificación de los géneros y especies en los aislados evaluados, estos no aportaron un código existente en dicha clasificación, ya que solo se identificó que tres de los aislados de la cumbre PI2 presentan actividad ureasa y siete aislados bacterianos utilizan el citrato como fuente de energía.

Tabla 9. Pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de Enterobacterias

Aislado	PPA	Lactosa	H ₂ S	Glucosa	Gas	Lisina	Indol	Ornitina	Citrato	Ramnosa	Urea	Motilidad
PVG628	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
PVG721	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
PVG729	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
PVG693	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
PVG694	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
PVG695	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
PVG745	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

8. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE ADN PLASMÍDICO EVALUADO EN LOS 22 AISLADOS SELECCIONADOS

La presencia de plásmidos se determinó mediante el Sistema de purificación minipreps en 6 de los aislados en estudio: PGV628, PGV631, PGV650, PGV655, PGV721 y PGV745. En los geles de agarosa de las figuras 16 y 17 se observa que 6 de los aislados en estudio presentan plásmidos de alto peso molecular (indicado con flechas amarillas) y solo 3 de ellos (PGV628, PGV631, PGV650) poseen plásmidos de bajo peso molecular (2.500 y 2.000 Kb) (indicado con flechas blancas).

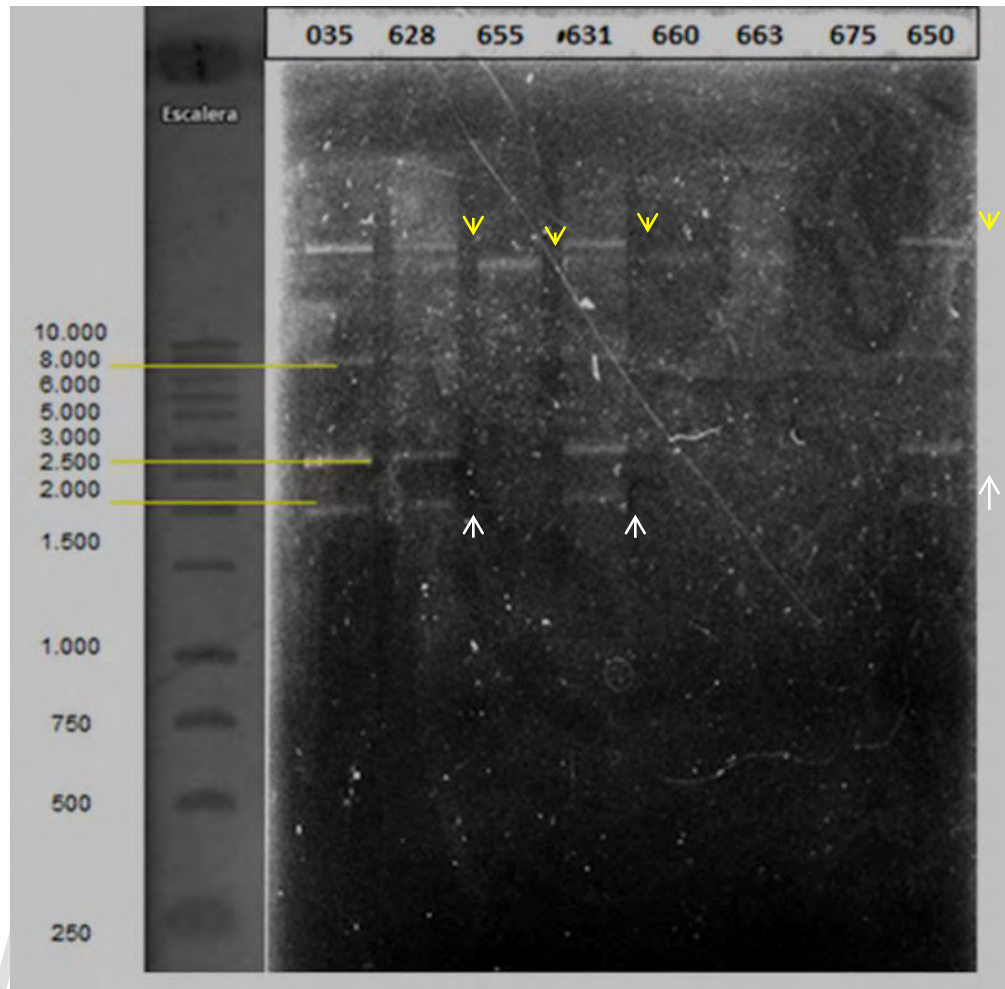


Figura 16. Resultado de electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando las bandas correspondientes a los plásmidos extraídos a partir de cada aislado. Las bandas señaladas con flechas amarillas pertenecen a los plásmidos de alto peso molecular y las flechas blancas corresponden a los plásmidos de bajo peso molecular. Marcador de peso molecular: Promega 1Kb ladder (750 – 10.000 pb).

695 711 718 721 729 742 745 748

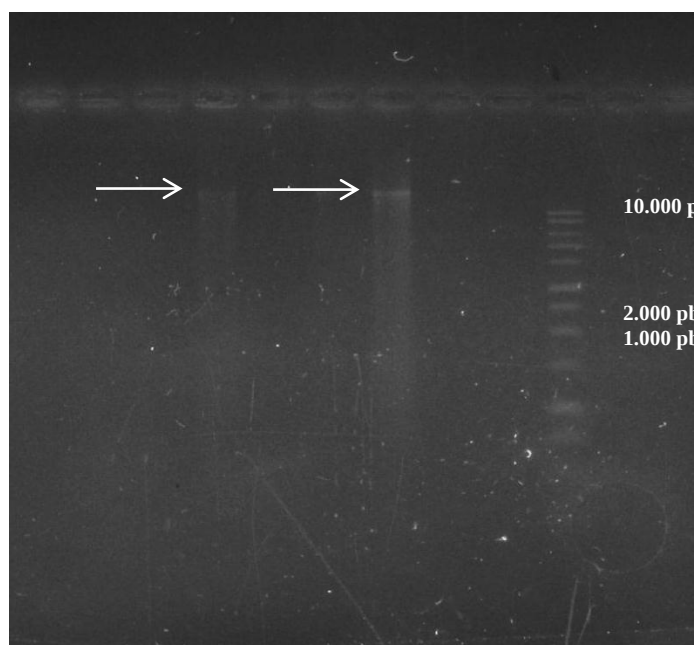


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa (1%) del ADN plasmídico purificado por el Kit comercial de Promega. Las flechas amarillas señalan los plásmidos de alto peso molecular y las flechas blancas a los plásmidos de bajo peso molecular. Marcador de peso molecular: Promega 1Kb ladder (750 – 10.000 pb).

9. CAPACIDAD DE LOS AISLADOS DE INHIBIR EL CRECIMIENTO DE *Pythium ultimum*

Este ensayo determinó que catorce de los 16 aislados señalados en la tabla 10 fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Pythium ultimum*.

Tabla 10. Ensayo de inhibición del crecimiento de *Pythium ultimum* realizado a 25 °C por 5 días.

Aislado	Inhibición	Aislado	Inhibición	Aislado	Inhibición	Aislado	Inhibición
PVG 628	-	PVG 692	+	PVG 663	+	PVG 721	+
PVG 655	+	PVG 694	+	PVG 661	+	PVG 729	+
PVG 631	+	PVG 695	+	PVG 711	+	PVG 735	+
PVG 742	+	PVG 745	+	PVG 718	+	PVG 748	-
CHA0 (control)	+						

La capacidad de los aislados de inhibir el crecimiento de *Pythium ultimum* se observa en la figura 18, con los aislados los PVG 692. PVG 655, PVG 695, PVG 742, PVG718, PVG 631 ; la inhibición causada por la cepa CHA0 de *P. fluorescens* (cepa control) fue mucho más marcada, también se muestra que el aislado PVG 748 no fue capaz de inhibir el crecimiento de *P. ultimum*.

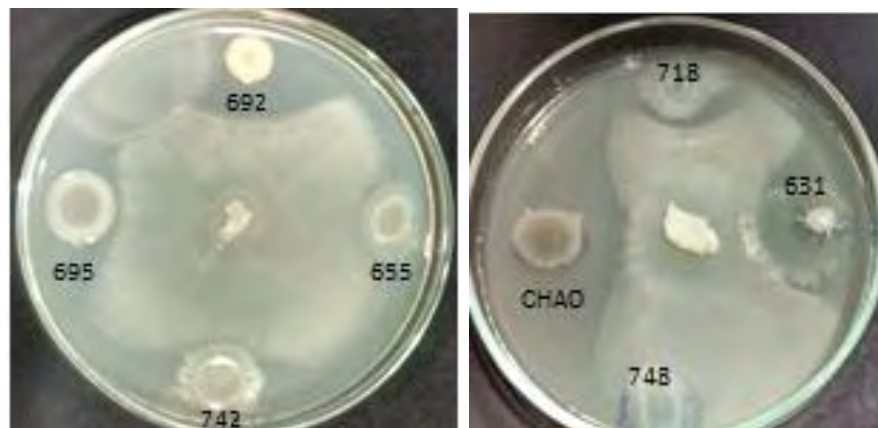


Figura 18. Ensayo de inhibición del crecimiento de *Pythium ultimum* realizado a 25 °C.

10. PARÁMETROS AMBIENTALES A MEDIDOS EN EL SITIO DE MUESTREO

10.1 Determinación del contenido de materia orgánica del suelo por el método de pérdida por ignición

Los porcentajes de MOS obtenidos para la cumbre MO6 en la cara Sur son las más bajos con un 2,4 %, para las otras orientaciones de la cumbre MO6 el porcentaje de MOS aumenta entre valores de 3 a 6 %; mientras que para la cumbre PI2 los valores de MOS se encuentra entre 13 y 19 %; mostrando como el porcentaje de MOS disminuye significativamente con respecto al aumento de altitud, comparando las cumbres PI2 y MO6, se evidencia que los valores del porcentaje de MOS son mayores para la cumbre PI2 (figura 19). Estos valores obtenidos de MOS son significativos entre las elevaciones evaluadas PI2 y MO6, mientras que los valores obtenidos para cada orientación no son significativos entre ellos, salvo una orientación en cada caso, para PI2 este y para MO6 oeste. Para este análisis se utilizó la Permanova de 2 vías con un $P = 0,0001$.

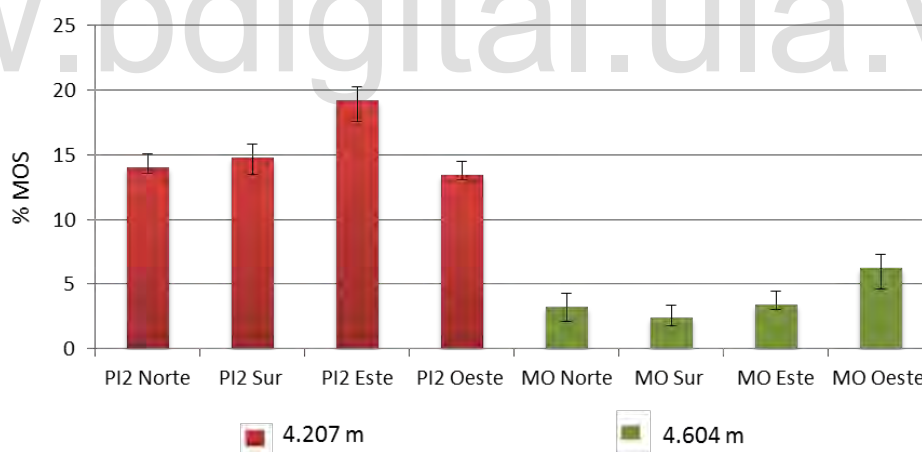


Figura 19. Porcentaje de Materia orgánica del suelo para las cumbres MO6 y PI2

* El color rojo corresponde a la cumbre PI2 (4.207 m) y el verde a MO6 (4.604 m)

10.2 Análisis de datos de temperatura

En la figura 20 los valores promedio más altos de temperatura del suelo a 10 cm de profundidad para la cumbre MO6 se observan en el mes de febrero en la cara sur con una temperatura de 8,4°C y para la cara Norte con 6,5°C; los valores promedio más bajos se observan para los meses de Julio y Agosto.

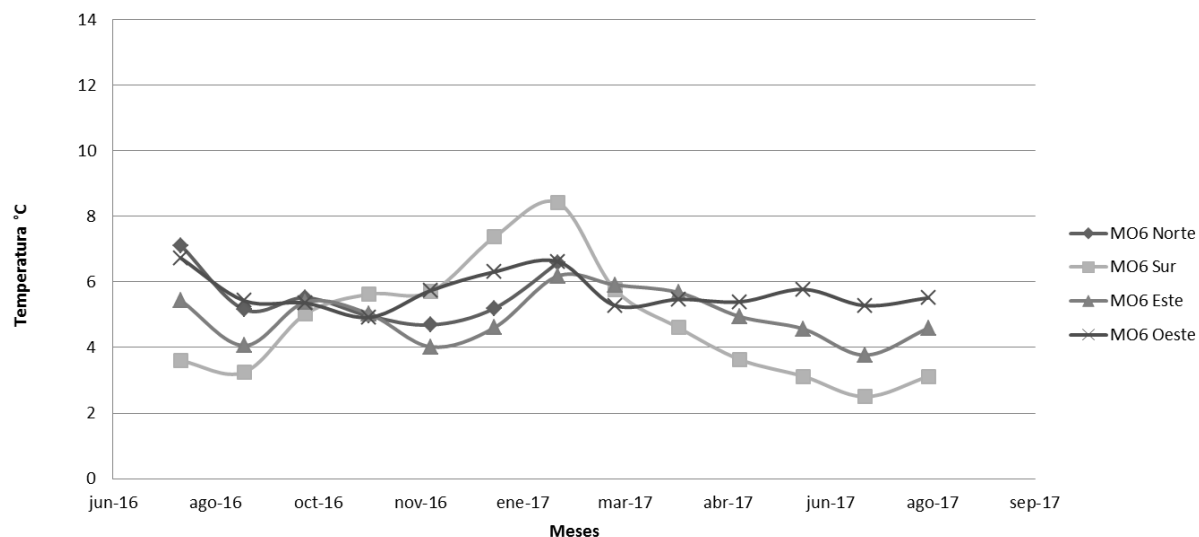


Figura 20. Valores promedio de temperatura del suelo para la cumbre M06 durante el período Agosto 2016 - Agosto 2017.

En la cumbre PI2 las temperaturas promedio más altas se alcanza en el mes de febrero, siendo la más alta la mostrada en la cara Oeste con 11,5°C; las temperaturas promedio más bajas se observan para los meses de Julio y Agosto.

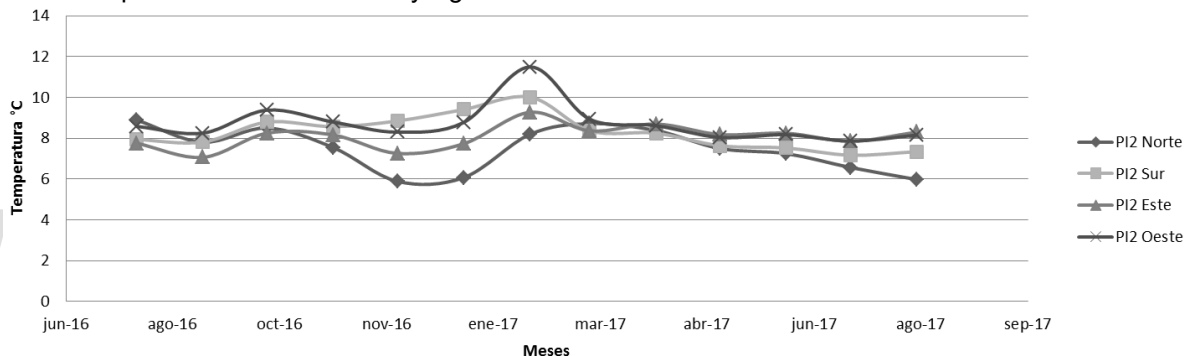


Figura 21. Valores promedio de temperatura del suelo para la cumbre PI2 durante el período Agosto 2016 - Agosto 2017.

Las temperaturas mínimas absolutas llegan a ser menores a cero solo en la cumbre MO6 Las caras que presentan las más bajas temperaturas son la Este y la Sur; la temperatura mínima absoluta más baja se observa en la cara Este con -0,986°C.

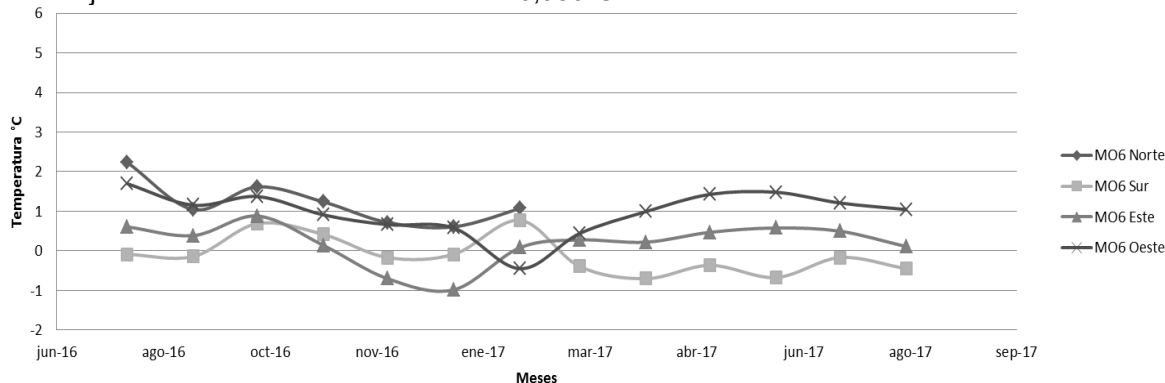


Figura 22. Valores de temperatura mínima absoluta para la cumbre M06 durante el período Agosto 2016 - Agosto 2017.

En la cumbre PI2 la temperatura mínima absoluta más baja se observa en la cara Norte con 0,55°C durante el mes de Abril, comenzando la época húmeda en el mes Abril (Figura 23).

La cumbre MO6 mantiene valores de temperatura mínima absoluta fluctuantes a lo largo del año entre -0 y 2 °C; mientras que la cumbre PI2 muestra datos entre 0 y 5 °C.

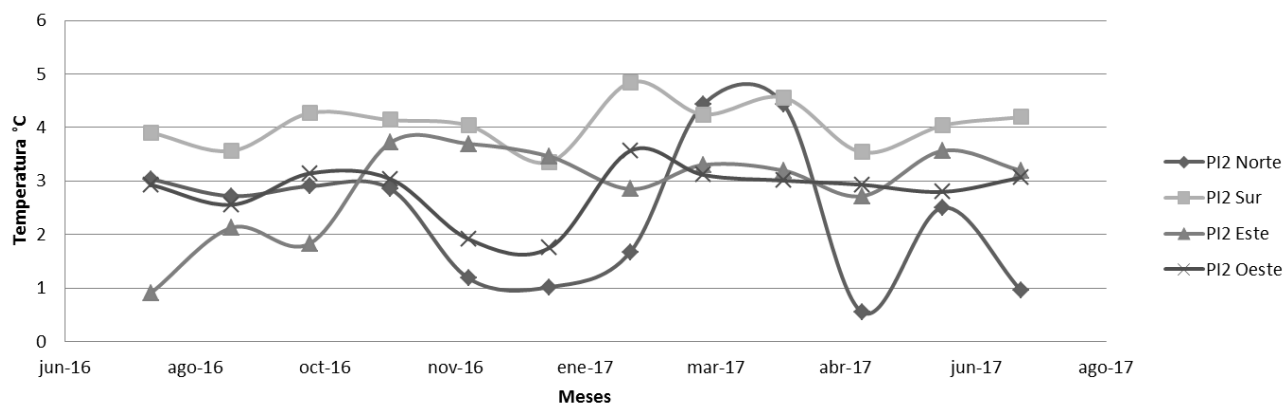


Figura 23. Valores de temperatura mínima absoluta para la cumbre PI2 durante el período Agosto 2016 - Agosto 2017.

Los valores mínimos promedio más bajos para la cumbre MO6 (figura 24) se observan en el mes de noviembre y diciembre.

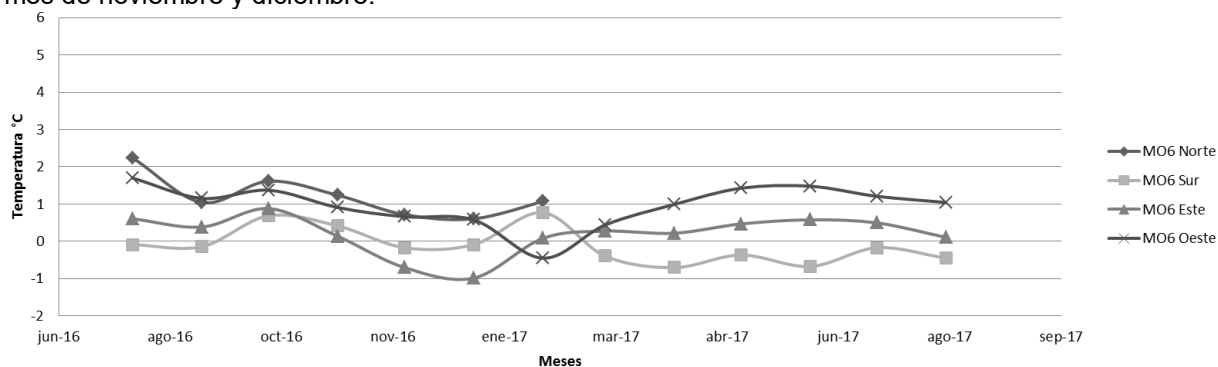


Figura 24. Valores de temperatura mínima promedio para la cumbre MO6 durante el período Agosto 2016 - Agosto 2017.

En la figura 24 se observan los valores mínimos promedio para la cumbre PI2, los datos más bajos de temperatura se alcanzan durante los meses de Noviembre a Febrero.

La cumbre MO6 mantiene valores de temperatura mínima promedio variables a lo largo del año entre 0 y 4 °C (figura 24); mientras que la cumbre PI2 muestra datos entre 2 y 6 °C (figura 25).

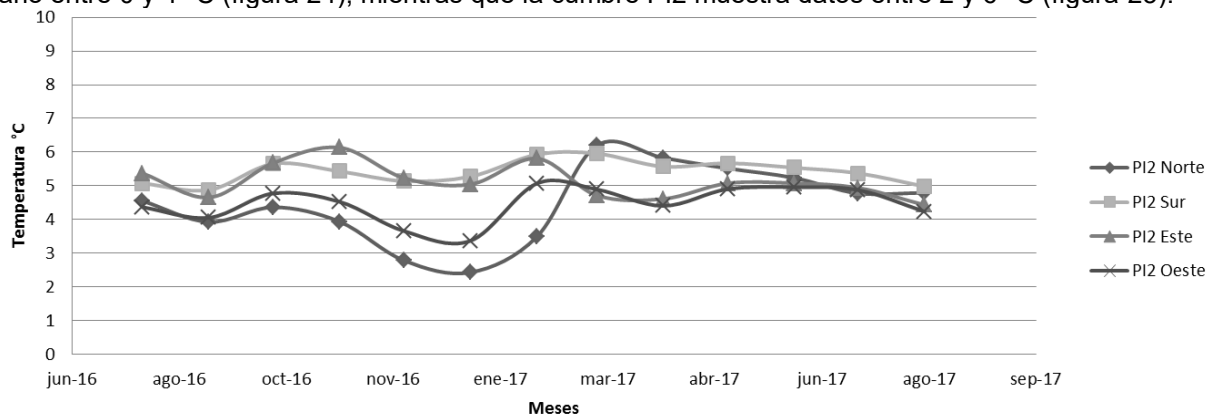


Figura 25. Valores de temperatura mínima promedio para la cumbre PI2 durante el período Agosto 2016 - Agosto 2017.

El valor máximo de temperatura en la cumbre MO6 (figura 25) es 26,47 °C en la cara Sur, y en la cara Oeste 19,4 °C, ambos datos durante el mes de enero 2017, estos dos valores representan los valores máximos absolutos más altos de temperatura alcanzados durante el año analizado.

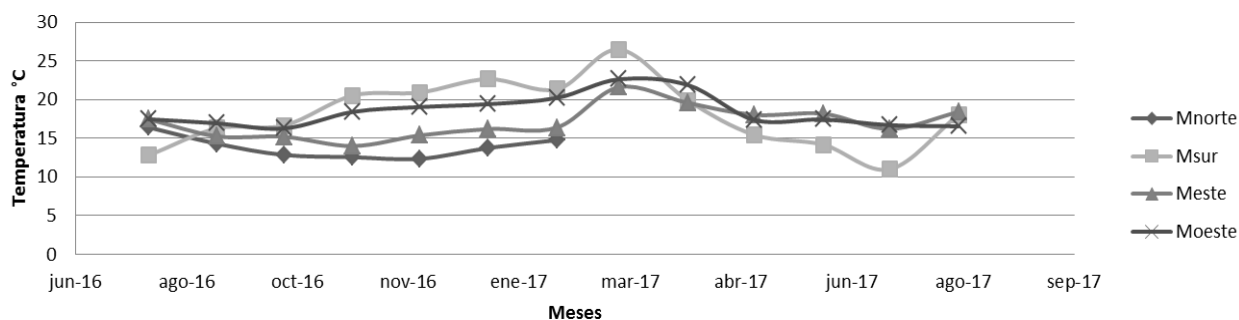


Figura 26. Valores de temperatura máxima absoluta para la cumbre M06 durante el período Agosto 2016 - Agosto 2017.

En la cumbre PI2 el valor máximo de temperatura alcanzó durante un año analizado (figura 27) corresponde a la cara Oeste con 23,9 °C en el mes de Febrero 2017.

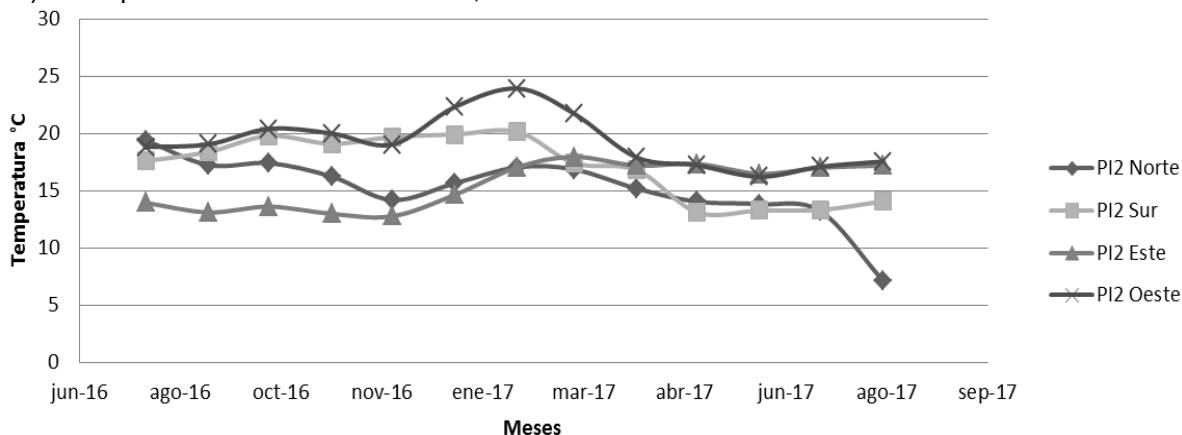


Figura 27. Valores de temperatura máxima absoluta para la cumbre PI2 durante el período Agosto 2016 - Agosto 2017.

Los valores máximos promedios más altos para la cumbre M06 (figura 28) se muestran durante los meses de Diciembre, Enero y Febrero; el valor más alto observado es 16,8 °C para la cara Sur y 15 °C para la cara Oeste durante el mes de enero; también se observa en el gráfico como estos valores máximos promedios tienden a disminuir a partir del mes de Marzo 2017 hasta Agosto 2017.

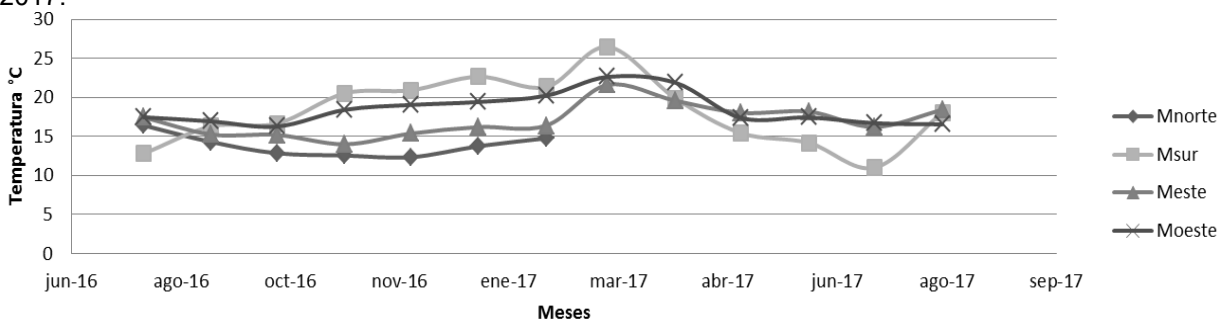


Figura 28. Valores de temperatura máxima promedio analizada durante un año para la cumbre M06

En la cumbre PI2 (figura 29) los valores de temperatura máxima promedio más altos se destacan durante el mes de enero 2017. Los valores correspondientes son: 20,5 °C para la cara Oeste ; 16,8 °C para la cara Sur; 14,9 °C cara Norte y 14,8 °C cara este. Los valores de temperatura máxima promedio tienden a disminuir a partir del mes de Marzo 2017 hasta Agosto 2017.

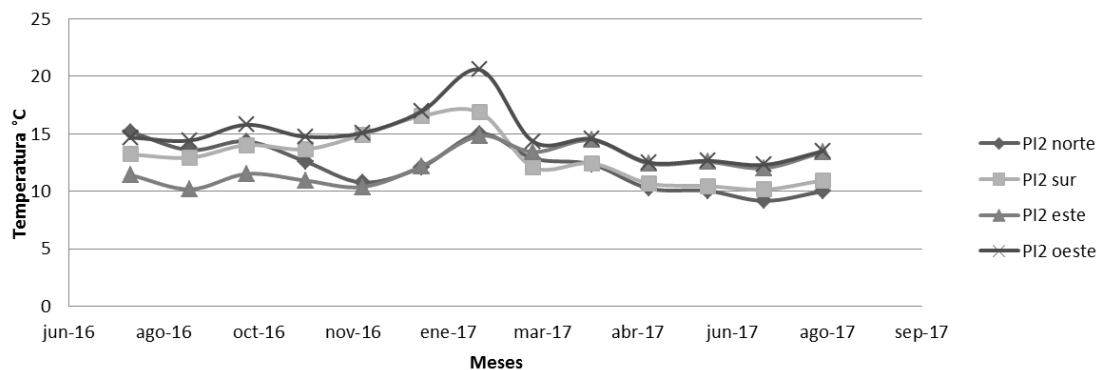


Figura 29. Valores de temperatura máxima promedio analizada durante un año para la cumbre PI2

11. COMPARACIÓN FUNCIONAL DE LOS AISLADOS PRESENTES EN LAS CUMBRES Y MO6

PI2

En la tabla 11 se muestra como la mayor abundancia de bacterias aisladas por orientación podría estar relacionada con un aumento en el porcentaje de MOS; se observa que en la cumbre PI2 donde se obtienen un mayor número de aislados el porcentaje de MOS tiene los valores más altos, entre 14 y 19%.

Tabla 11. Porcentaje de MOS y Número de aislados para cada orientación en PI2 y MO6

Aislados	Orientación	% MOS	Aislados	Orientación	% MOS
22	PI2 Norte	14,067	9	MO Norte	3,268
45	PI2 Sur	14,817	13	MO Sur	2,407
44	PI2 Este	19,227	11	MO Este	3,437
26	PI2 Oeste	13,459	16	MO Oeste	6,318

En la tabla 12 se muestra una comparación basada en las principales características evaluadas en este trabajo; los resultados obtenidos para la disolución de fosfatos, resistencia a metales pesados y antibióticos, inhibición del fitopatógeno *P.ultimum* y los rangos de crecimiento a tres temperaturas evaluadas.

Tabla 12. Comparación funcional de los aislados seleccionados presentes en PI2 y MO6

Aislado	Origen	Fenotipo	Rango de crecimiento			Resist/Antib Probados	Toler/Metales Probados	Inhibición <i>P.ultimum</i>
			10°C	20°C	30°C			
PVG628	M06,Norte	DFM+	+	+	+	6/7	5/5	-
PVG631	M06,Norte	DFM+	+	+	+	5/7	5/5	+
PVG633	M06,Norte	DFM+	+	+	+	6/7	5/5	
PVG637	M06,Oeste	DFM+	+	+	+	5/7	5/5	
PVG640	M06,Oeste	DFM+	+	+	-	4/7	5/5	
PVG650	M06,Este	DFM+	+	+	-	4/7	3/5	
PVG655	M06,Este	DFM+	+	+	-	4/7	5/5	+
PVG660	M06,Este	DFM+	+	+	-	1/7	4/5	
PVG661	M06,Sur	DFM+	+	+	-	4/7	5/5	+
PVG663	M06,Sur	DFM+	+	+	-	4/7	3/5	+
PVG692	PI2, Sur	DFM+	+	+	-	5/7	4/5	+
PVG693	PI2, Sur	DFM+	+	+	+	6/7	4/5	
PVG694	PI2, Sur	DFM+	+	+	-	4/7	5/5	+
PVG695	PI2, Sur	DFM+	+	+	-	5/7	5/5	+
PVG711	PI2,Norte	DFM+	+	+	+	5/7	4/5	+
PVG718	PI2,Norte	DFM+	+	+	+	4/7	4/5	+
PVG721	PI2,Norte	DFM+	+	+	-	6/7	4/5	+
PVG729	PI2,Oeste	DFM+	+	+	+	5/7	2/5	+
PVG735	PI2,Oeste	DFM+	+	+	+	4/7	3/5	+
PVG742	PI2,Este	DFM+	+	+	+	2/7	4/5	+
PVG745	PI2,Este	DFM+	+	+	-	5/7	4/5	+
PVG748	PI2,Este	DFM+	+	+	-	6/7	4/5	-

DISCUSIÓN

La presente investigación se enfoca en la vida microbiana específicamente en las bacterias que viven a bajas temperaturas, y que cumplen roles importantes, como la solubilización de fosfatos que podrían promover el crecimiento de plantas a bajas temperaturas. Para obtener este componente microbiológico se aplicaron técnicas dependientes de cultivo, que permitieron el aislamiento de bacterias cultivables.

El uso de técnicas dependientes de cultivo ha sido esencial para el desarrollo de la microbiología y de estrategias para combatir las bacterias patógenas, sin embargo, se conoce que existen muchos microorganismos que no crecen en los medios que preparamos en el laboratorio y no se pueden cultivar. Se han utilizado varias estrategias diferentes para aumentar con éxito el número de células cultivadas a partir de muestras ambientales, así como para aislar nuevos taxones bacterianos. Algunos ejemplos de estrategias que se han utilizado con éxito para mejorar la eficiencia del cultivo incluyen imitar el entorno natural, separar físicamente las células para disminuir la competencia o inhibidores del crecimiento y modificar los medios de crecimiento. Varios estudios han demostrado empíricamente aumentos en los recuentos de unidades formadoras de colonias (UFC) cuando se agregó catalasa o piruvato al medio lo que indica que el estrés oxidativo puede inhibir el crecimiento de colonias. La variedad de factores que pueden estar limitando el cultivo en el laboratorio es amplia, por lo que es un desafío identificar los componentes específicos del medio de crecimiento necesarios para el crecimiento celular o inhibir su crecimiento. Los estudios sobre factores específicos en agar que conducen a la inhibición del crecimiento bacteriano son limitados, se necesita más investigación ya que numerosos grupos filogenéticos de microorganismos ambientales aún carecen de representantes cultivados; sin embargo las nuevas técnicas de secuenciación masiva han dejado atrás estas limitaciones y han puesto de manifiesto la existencia de una enorme cantidad de microorganismos no cultivables, permitiendo la identificación de comunidades microbianas revelando sus posibles funciones y relaciones filogenéticas. No obstante, el aislamiento de microorganismos sigue siendo necesario para que los microbiólogos estudien la genética y fisiología en profundidad en el laboratorio así como para la conservación de los mismos (Tanaka y col., 2014).

El uso de técnicas dependientes de cultivo en este trabajo sugiere que los medios agarizados tales como: R2A, LB y Agar Malta, fueron más eficientes en la recuperación exitosa de los mismos. Algunos aspectos a considerar entre este grupo de medios, es el hecho que se trata de medios ricos, que contienen un amplio rango de sustancias que sirven de precursores y compuestos que potencialmente activan diferentes rutas biosintéticas. El éxito de estos medios puede estar relacionado con su papel en propiciar una rápida recuperación de células dañadas, alto contenido de fuentes oxidables de carbono, presencia de vitaminas y aminoácidos entre otras cualidades. Por otra parte los medios PD y PZ con los cuales se obtuvo un menor número de aislados, se deba a que generalmente estos dos medios, son utilizados para el aislamiento de levaduras y hongos miceliales, dado sus limitaciones nutricionales.

Es de resaltar que el crecimiento bacteriano en el aislamiento primario, pareció ser prolongado, de 7 días de incubación a 10 °C, comparando este resultado obtenido con lo reportado para bacterias provenientes de hielo, este tiempo fue sustancialmente más corto, quizás se deba a que las bacterias en el suelo están metabólicamente más activas que en el hielo. Este retardo en el crecimiento se explica porque las células requieren reparar el daño provocado por múltiples factores de estrés térmico y con el restablecimiento de las funciones metabólicas que han permanecido con baja actividad o inactivas en el suelo.

Una vez que los morfotipos bacterianos fueron reactivados y su actividad metabólica fue reestablecida se incubaron a 15°C, determinando que todos los aislados tienen un máximo de crecimiento en dos días en el medio agarizado papa dextrosa, a pesar de que algunas colonias bacterianas no fueron aisladas inicialmente en dicho medio. El medio PD se utilizó para el aislamiento de los aislados bacterianos en todas las siguientes pruebas realizadas.

Muchos de los morfotipos bacterianos obtenidos en el aislamiento primario, manifestaron el fenotipo DFM⁺ (tabla 3). Estos aislados bacterianos psicrófilos o psicrotolerantes poseen la capacidad de disolver Ca₃(PO₄)₂ a 15 °C, condición a la cual los mecanismos de disolución de P suelen ser menos efectivos, por lo tanto es posible que bacterias de fenotipo DFM⁺ puedan promover el

crecimiento vegetal en suelos de páramo, ya que estas bacterias pueden disolver el fósforo insoluble a formas de fósforo asimilables por las plantas.

Proponemos que la capacidad de disolución de fosfatos en estas bacterias DFM⁺ se debe a la liberación de compuestos difusibles al medio extracelular, tales como ácidos orgánicos resultantes de la oxidación directa de la glucosa (VODG), entre ellos el ácido glucónico como uno de los principales mecanismos para la solubilización del fosfato mineral en bacterias Gram negativas. El ácido glucónico es uno de los ácidos orgánicos reportados con mayor frecuencia, en el trabajo de Balcazar y colaboradores (2015), demostraron que aislados provenientes de glaciares venezolanos son capaces de producir y liberar elevadas concentraciones de ácido glucónico. Se ha reportado que la acidificación es el mecanismo de disolución de P más común en toda la Cordillera Andina, hecho que corresponde con los resultados cualitativos en las cajas de NBRIP, debido a que es un medio sin capacidad de tamponamiento de pH. En base a estos resultados obtenidos, se plantea identificar qué tipos de ácidos orgánicos producen estos microorganismos con fenotipo DFM⁺ en ecosistemas de alta montaña.

La VODG es una de las rutas metabólicas bacterianas más importantes implicada en la asimilación de azúcares y en la eficiencia de disolución de fosfatos minerales. La función principal de la ruta de la VODG y como lo sugiere la literatura es la obtención de energía, sin embargo esta ruta metabólica ha demostrado tener importantes implicaciones ecológicas. Básicamente mediante el servicio que prestan bacterias solubilizadoras de P, en aumentar la concentración de este macronutriente en formas asimilables. Otros ácidos orgánicos pueden ser producidos a partir de diferentes carbohidratos, tales como: galactosa, ribosa, xilosa y manosa, tanto sustratos como no-sustratos de la VODG, permiten la disolución de fosfatos a bajas temperaturas (Rodríguez y Fraga, 1999). Esto se observa en los microorganismos que colonizan la rizósfera que utilizan exudados de las raíces como fuente de nutrientes (Philippot y col., 2013). En efecto, además de incluir aminoácidos, ácidos orgánicos, y otras macromoléculas, estos exudados son ricos en azúcares como glucosa, sacarosa, arabinosa, ribosa y fructosa. Esta capacidad de utilizar diferentes fuentes de carbono para disolver fosfatos de forma eficiente a baja temperatura, puede jugar un papel fundamental cuando se considera evaluar el potencial de las bacterias con fenotipo DFM⁺ para ser empleados en procesos como la fabricación de biofertilizadores, el uso de estos biofertilizantes disminuyen los problemas relacionados con el uso de fertilizantes químicos (Kamilova y col., 2006).

Se ha demostrado que algunos microorganismos pueden solubilizar fosfatos insolubles, sin producir cualquier tipo de ácidos orgánicos. Yi y colaboradores (2008) demostraron que la producción de exopolisacáridos por los aislados *Enterobacter* sp. EnHy-401, *Arthrobacter* sp. ArHy-505 y *Azotobacter* sp. AzHy-510, confería a estos microorganismos mayor capacidad de solubilización de fosfatos insolubles en relación a la cepa *Enterobacter* sp. EnHy-402, la cual no produce exopolisacáridos. Si bien en este trabajo no se evaluó con certeza la producción de exopolisacáridos, los aislados estudiados presentan características comúnmente asociadas al estilo de vida psicrófilo, entre la que destaca una consistencia mucosa de la colonia, hecho que bien puede deberse a la presencia de este tipo de sacárido. Además los exopolisacáridos se han asociado con la supervivencia a largo plazo en las matrices congeladas y puede estar implicada en la protección de las células contra las lesiones provocadas por las bajas temperaturas; por otra parte, estos también están involucrados en facilitar la captura y concentración de los nutrientes y la retención de agua (D'Amico y col., 2006).

Se plantea que los aislados caracterizados e identificados con fenotipo DFM⁺ se les debe aplicar un estudio completo tomando en cuenta ocho factores fundamentales que están relacionados con la capacidad de los aislados de: disolver $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y otras fuentes de fósforo como AlPO_4 y FePO_4 , disolver fosfatos en medio líquido, producir abundantes ácidos orgánicos, producir fitohormonas, e inhibir el crecimiento de fitopatógenos. Por último destaca la necesidad de realizar ensayos tanto *in vitro* como *in situ* con una planta modelo y estudios de parámetros relacionados con la nutrición del fósforo en las plantas (Bashan y col., 2013).

Aislados con fenotipo DFM⁺ fueron caracterizados a nivel morfológico y fisiológico, muestran un predominio de colonias pequeñas, su morfología celular se restringió a bacilos cortos y cocabacilos (Tabla 5); estas características observadas en los aislados han sido reportadas como típicas a la adaptación de las células bacterianas a flujo de nutrientes, factores ambientales extremos impuestos sobre las células durante su transporte y deposición en ambientes con bajas temperaturas

(Abyzov y col., 2005). Las bacterias desarrollan diversas adaptaciones en respuesta a presiones selectivas, por lo tanto, la uniformidad en tamaño y forma observada en los aislados parece conferir algún tipo de ventaja funcional en estos rasgos para hacer frente a las condiciones ambientales (Kotch, 1996).

Para complementar la caracterización se utilizó la técnica del KOH junto a la prueba de Gram que permitió determinar que los 22 aislados evaluados son gram negativos. El hecho de encontrar mayor proporción de bacterias Gram negativas se ha reportado en estudios hechos por Margesin (2009), donde la composición de bacterias Gram negativas aumenta en suelos alpinos y suelos subalpinos, mientras que la cantidad de bacterias Gram positivas disminuye con la altitud (Margesin, 2009); también se han demostrado la capacidad de las bacterias Gram negativas para ser más tolerantes a los ciclos de congelación-descongelación y para crecer mejor a pH bajo típico de suelos de alta montaña (Aislabie y col., 2006).

Hay que mencionar además, que una de las adaptaciones de los psicrófilos en las bajas temperaturas es la producción de pigmentos. En este sentido, los aislados PVG628, PVG637, PVG640, PVG650, PVG661, PVG663, PVG718 producen un pigmento amarillo (tabla 5), posiblemente del tipo carotenoide. Los carotenoides se han asociado con la protección de las bacterias a la alta radiación UV, a las lesiones provocadas a nivel celular por la formación de cristales de hielo y al aumento de la fluidez de la membrana a bajas temperaturas (Feller y Gerday, 2003; De Maayer y col., 2014).

Las muestras de suelo con las que se trabajaron en este estudio fueron tomadas a 10 o 15 cm de profundidad en suelo desnudo, identificándose solo bacterias gram negativas, quizás la estructuración espacial de las comunidades microbianas del suelo y los procesos microbianos varían con la profundidad y están directamente vinculados a la biomasa microbiana, la actividad y la diversidad (Rime y col., 2014). No existen estudios que respalden que la organización espacial en las comunidades microbianas y la distribución vertical de microorganismos en los suelos está restringida o sigue algún patrón que dependa de la profundidad, considerando lo descrito en la literatura existiría una diferencia si las muestras son tomadas en la rizósfera en lugar de suelo desnudo, los resultados podrían variar; ya que se ha demostrado que: (i) es en la rizósfera donde existe una alta disponibilidad de fuentes de carbono para ser metabolizadas por plantas y microorganismos, y (ii) en la rizósfera existe una intensa comunicación química entre plantas y microorganismos, cuyo objetivo es que plantas y microorganismos se adapten a los cambios ambientales ocurridos en esta región especial del suelo. La cobertura vegetal y específicamente la naturaleza química de los exudados radiculares es considerado el elemento más determinante en el ensamblaje de las comunidades microbianas, lo cual se debe a que estas secreciones generan un ambiente selectivo altamente competitivo mediado por el potencial para ser metabolizados (Goldstein, 1995). Con estas evidencias se puede afirmar que si se aíslan bacterias de la rizósfera la densidad poblacional podría aumentar y ser más diverso el número de fenotipos que se podrían obtener.

Para continuar con la caracterización de los aislados bacterianos seleccionados se abordó un aspecto que tiene que ver con sus características fisiológicas, las cinéticas de crecimiento y rendimiento celular de los aislados a diferentes temperaturas (10-20-30°C); estos fueron evaluados con el objetivo de catalogarlos como psicrófilos o psicrotolerantes. Tomando en cuenta las consideraciones propuestas por Margesin (2009) para definir un microorganismo psicrófilo, se catalogaron 3 aislados como psicrófilos y 19 como psicrotolerantes; estos aislados bacterianos exhiben una producción de biomasa mayor a bajas temperaturas, sin que esto signifique que tengan sus más alta tasa de crecimiento, de modo que esto sugiere que la capacidad de crecer a una tasa menor a bajas temperaturas les proporciona una ventaja para sobrevivir en ambientes pobres en nutrientes; una mayor tasa de crecimiento produciría un rápido agotamiento de los nutrientes y una muerte rápida de la población bacteriana, en consecuencia un crecimiento más lento es compensado con una mayor producción de biomasa (Russel y col., 1990).

Podemos mencionar otra caracterización la cual describe la resistencia de los aislados a antibióticos. Los resultados obtenidos muestran que más del 58% de los aislados presentaron resistencia a múltiples antibióticos, las más frecuentes fueron: ampicilina, penicilina, estreptomycin, cloranfenicol y kanamicina, mientras que el 2% de aislados fueron capaz de crecer en presencia de tetraciclina y un 31% en ácido nalidíxico (Figura 8). Estas observaciones son consistentes con hallazgos que han demostrado que las comunidades de bacterias psicrófilas/psicrotolerantes con frecuencia exhiben resistencia a múltiples antibióticos (Petrova y col., 2009), las bacterias gram negativas aisladas de muestras de suelo son filogenéticamente diversas y altamente resistentes a

una serie de antibióticos debido a que muchos de estos microorganismos ya contaban con marcadores genéticos de resistencia y que estas mutaciones pueden deberse a las condiciones de estrés, lo que promueve la adquisición de resistencia a antibióticos por la vía THG.

Los estudios con condiciones abióticas cambiantes, como el aumento de temperatura, han informado que las perturbaciones ambientales pueden alterar la estructura de la comunidad microbiana del suelo, y que esta a su vez, puede afectar los genes de resistencia a antibióticos presentes en la dinámica del suelo (Dunivin y Shade, 2018).

Los resultados obtenidos en este trabajo pueden considerarse como una evidencia en favor de que los genes de resistencia se difundieron mucho antes de la era de los antibióticos terapéuticos y sugieren un papel importante de la transferencia horizontal y vertical de genes en la aparición de nuevas especies resistentes.

Además de poner en evidencia la resistencia a múltiples antibióticos, en el presente trabajo también se demostró la resistencia de varios de los aislados de crecer en presencia de níquel (NiSO_4), cobre (CuSO_4), cromo ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), cobalto ($\text{Co(NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y zinc (ZnCl_2) en su concentración más alta evaluada 200ppm; destacando que más del 60% de los aislados son resistentes a Zn y Cr a la concentración de 200ppm. Estas altas resistencias evidencian que los metales esenciales juegan un rol importante en la actividad de muchas reacciones bioquímicas (Wakatsuki, 1995) y que estas a su vez dependen del estado de oxidación y la concentración en que se encuentren, ya que pueden llegar a ser tóxicos (Ji y Silver, 1995). Por ejemplo el Cr (VI) es muy tóxico para la mayoría de las bacterias, el Cr (III) es relativamente inofensivo por su incapacidad de atravesar la membrana celular (Díaz y col., 2006).

Ji y Silver (1995) sugirieron que la resistencia a metales pesados evolucionó poco después de la aparición de los primeros procariotas, lo cual explicaría su alta distribución en el mundo bacteriano. Existen evidencias que los mecanismos de resistencia surgieron debido a que la mayoría de los ambientes colonizados por bacterias contienen trazas tanto de metales como de metaloides, esto justificaría porque en ambientes no intervenidos como el páramo altiandino se encontraron altas resistencias a metales pesados (Ji y Silver, 1995).

La resistencia de antibióticos y metales pesados se ha vinculado con la adquisición de genes de resistencia, ya sea mediante procesos de mutaciones espontáneas, transferencia horizontal de genes o elementos genéticos móviles como plásmidos conjugativos, transposones o integrones (Wright y Poinar, 2012; Sudha y col., 2013).

La resistencia a metales está íntimamente relacionada con la resistencia a antibióticos e inclusive muchos de los genes que codifican esta resistencia se localizan en los mismos vectores de transferencia (Belliveau y col., 1991) sin embargo, hay una diferencia entre los genes de resistencia cromosomales y los genes plasmídicos: la resistencia a metales esenciales, por lo general está asociada al cromosoma, mientras que en los plásmidos se localiza la mayoría de determinantes de resistencia a otros metales; se ha descrito que la resistencia al cobre y níquel se localiza en plásmidos (Ji y Silver, 1995).

Estas resistencias observadas en los aislados son consistentes con los reportes hechos para ambientes extremos, los cuales suelen estar colonizados por microorganismos con estrategias K, estos generalistas cuentan con genomas grandes que le confiere cierta ventaja a la hora de albergar una amplia gama de colecciones genéticas que facilitan la capacidad de colonizar una variedad tan amplia de ambientes, esto demuestra la relación entre el tamaño del genoma y la adaptación a nichos para cumplir múltiples funciones en un entorno competitivo como el del suelo (Farrar y col., 2014).

Como existen fuertes evidencias que los genes que otorgan estas resistencias comúnmente se encuentran ligados y pueden transferirse a través de plásmidos (Summers, 2002), se evaluó el perfil plasmídico de veintidós aislados; logrando poner en evidencia la presencia de ADN extracromosomal (plásmidos) de alto peso molecular (>10 kb) en los aislados PGV628, PGV631, PGV650, PGV655, PGV721 y PGV742. La presencia de estos plásmidos podría estar relacionada con alguna de las resistencias a antibióticos y metales pesados observados en estos aislados. Los plásmidos de bacterias psicrófilas o psicrotolerantes revisten un particular interés, porque, muy probablemente contribuyen portando los genes necesarios para permitirle a las bacterias adaptarse a su ambiente natural (Ochman y col., 2000) estos elementos móviles ejercen plasticidad sobre el genoma bacteriano y facilitan la activación o inactivación de genes, lo que da como resultado la alteración de la red metabólica y la concesión de una ventaja evolutiva selectiva en entornos altamente variables (Farrar y col., 2014).

La manipulación para la extracción de ADN extracromosomal de bacterias provenientes de ambientes extremos es muy delicada, por lo general se encuentran en bajo número de copias por

célula y un alto peso molecular, esto impide que pueda ser observados fácilmente. No obstante, por tratarse de microorganismos ambientales, optamos por emplear dos metodologías para el aislamiento de plásmidos, la metodología propuesta por Kotchoni (2003) y un sistema de purificación minipreps, ambos basados en el tratamiento con detergentes y álcali para lisis celular. Sin embargo, solo la metodología del kit comercial Promega permitió la extracción del ADN plasmídico, estos protocolos son específicos para el aislamiento de plásmidos con un alto número de copias y bajo peso molecular en bacterias modelo como *E.coli*, lo que podría representar una limitante ya que otros aislados podrían presentar plásmidos y no se pudo determinar.

Se observó a nivel cualitativo que los aislados seleccionados son capaces de sintetizar enzimas extracelulares activas a bajas temperaturas como proteasas, amilasas, β -galactosidasa y catalasas, por lo que se especula que sean potenciales cepas que podrían constituir una herramienta biológica muy interesante para su utilización y aprovechamiento en procesos biotecnológicos, por ello se sugiere comprobar de forma cuantitativa si la producción de estas cepas que podría ser eficientes en la producción de estas enzimas.

Muchas de los procesos biológicos que tienen lugar en el suelo, son catalizadas por enzimas producidas por los microorganismos presentes en él. Los estudios de enzimología del suelo han permitido reagrupar bajo 3 tipos diversos, el origen de las enzimas: el primero es atribuido a los microorganismos vivos y muertos presentes en el suelo; el segundo se debe a los animales del suelo y el tercero a las plantas o a parte de los tejidos vegetales. Algunos de éstos catalizan la degradación de compuestos de alto peso molecular, pero con frecuencia ocurre que es difícil establecer si un enzima está presente extracelularmente o si se vuelve disponible sólo a continuación de la autólisis celular. Los estudios llevados a cabo sobre hongos tal como *Aspergillus oryzae*, han mostrado que las enzimas se vuelven disponibles en tiempos sucesivos: primero aparecen las carbohidrasas y las fosfatasa, siguiéndoles las proteinasas y las esterasas, apareciendo finalmente las catalasas. Es interesante notar cómo las catalasas que pueden ser consideradas típicas enzimas endocelulares, han sido encontradas con mucha frecuencia extracelularmente (Gimenez, 1984).

Aunado a esto, se comprobó que los aislados bacterianos podría estar cumpliendo algún rol ecológico mediante el biocontrol de fitopatógenos, para ello se probó uno de los microorganismos fitopatógenos más comunes que atacan a las plantas, específicamente los hongos, que corresponden al grupo que más enfermedades ocasionan. Se evaluaron 22 aislados de los cuales 14 producen compuestos tóxicos difusibles que afectan el crecimiento de otros microorganismos, en este caso inhibieron el crecimiento de *Pythium ultimum*, un fitopatógeno que se caracteriza por causar la podredumbre de las raíces de algunas especies de plantas (Zitnick, 2017).

El género *Pythium*, posee un amplio rango de plantas hospedantes a las que ataca, entre ellas se encuentran *Solanum tuberosum*, *Lactuca sativa*, *Triticum* spp, *Solanum lycopersicum*; su distribución es cosmopolita y produce la enfermedad conocida como *Damping-Off*, (Ahogamiento y marchitamiento) produciendo muerte de la planta antes o inmediatamente después de la emergencia (Marchitamiento de preemergencia y postemergencia). Las bacterias que tienen la capacidad de producir numerosas sustancias antibióticas y que a su vez inhiben el crecimiento de competidores microbianos han sido estudiados en *Pseudomonas fluorescens* quien produce sustancias antimicrobianas como el antibiótico 2,4-diacetil-floroglucinol, que inhibe el crecimiento de *Pythium* spp quien causa la enfermedad del *damping-off* (Flores, 2010).

En este estudio, también se analizó el porcentaje de MOS demostrando que disminuye significativamente con respecto a la altitud en las cumbres evaluadas a 4.604 m y a 4.207 m; inferimos que esta disminución en la cumbre MO6 se relaciona directamente con la baja cobertura y densidad de la vegetación presentes en la cumbre (Llambí y Ramírez; 2017).

Al analizar detalladamente los valores del porcentaje de MOS (tabla 11) se observa que podría existir una relación entre el número de bacterias aisladas y el porcentaje de MOS presente en los sitios estudiados; en la cumbre MO6 se hallaron los valores más bajos de materia orgánica y es allí, donde se obtienen menos microorganismos, comparado con el sitio PI2, donde el mayor número de aislados se relaciona con la mayor proporción de materia orgánicos. De esta manera es posible explicar cómo la materia orgánica actúa como fuente de sustratos orgánicos y energía, ya que contiene el C y N orgánico necesarios para el crecimiento de los microorganismos. Esta idea planteada se fundamenta con los reportes realizados por Uchida y col., 2000; Lipson, 2007; Margesin, 2009; quienes demostraron que la presencia de MOS en ecosistemas altiandinos depende tanto de la actividad microbiana como de la actividad biodegradante que continuamente tienen lugar en el ecosistema.

Por otra parte, en el Páramo de Piedras Blancas, las rosetas gigantes como *Coespeletia timotensis* proporcionan un suministro constante de necromasa al suelo, lo que puede inducir un incremento de la materia orgánica cerca de la base de la roseta. Pérez (1991) en dicha investigación reporta, que a una altitud de 4.400 m .se evidencia que el porcentaje de MOS se encuentran alrededor de 2 % en áreas abiertas, y con un aumento del 36 y 52% bajo las rosetas de *Coespeletia timotensis* y *Espeletia semiglobulata*. Ramírez y col., (2015) reportan que la materia orgánica se encuentra alrededor del 2% en áreas abiertas y aumenta a 3% bajo la copa de arbustos de *Hypericum laricifolium*. Estos datos reportados para áreas abiertas se corresponden con los datos obtenidos en este trabajo para la cumbre MO6 en la cara Sur con un 2,4 % de MOS, sin embargo para las otras orientaciones se observó que en la cumbre MO6 el porcentaje de MOS aumenta entre valores de 3 a 6 %; mientras que para la cumbre PI2 los valores de MOS se encuentra entre 13 y 19 % (datos mostrados en tabla 11), estos valores son mayores que los encontrados en la cumbre MO6 puesto que en la cumbre PI2 existe mucho más cobertura vegetal que proporciona un suministro constante de necromasa al suelo.

Se estima que la acumulación de materia orgánica en suelos de Páramo Andino se encuentra alrededor de 50 Kg·m⁻², lo que representa más de 10 veces la acumulación de fitomasa. Esta MOS es particularmente estable a la descomposición confiriéndole al ecosistema cierta resistencia al disturbio. La alta acumulación de MOS tiene una influencia decisiva en el funcionamiento del ecosistema al determinar la capacidad de retención de agua y de nutrientes. Su acumulación se explica porque la biomasa de microorganismos de suelo representa menos del 1% de la MOS, lo que implica una baja actividad descomponedora y refuerza la idea de la estabilidad de la MOS. (Llambí y col., 2013).

El carbono orgánico del suelo (COS) es una medida de la cantidad total de carbono orgánico en el suelo. El interés en COS se fundamenta en que esta medida es un indicador de calidad de suelo. En consecuencia, su variación puede tener implicaciones en procesos ambientales como fertilidad de suelo, erosión y flujos de gases efecto invernadero (Stolbovoy y col., 2007) por lo que determinar con alta precisión el carbono en el suelo es esencial para cuantificar el secuestro de carbono.

En el ecosistema de páramo, entre 0 y 40 cm de profundidad el carbono almacenado en el suelo puede variar entre 119 y 397 toneladas por hectárea (t/ha), bajo vegetación natural. Posiblemente los valores más elevados de COS bajo vegetación natural se deban a la mayor protección de la superficie del suelo propiciada por el tipo de cobertura vegetal. Por ejemplo, sitios con densas coberturas como las briofitas y especies arbustivas que aíslan el suelo de factores como precipitación e incidencia directa de radiación solar, pueden presentar mayor cantidad de carbono orgánico, porque hay menor descomposición de materia orgánica. Así mismo, la mayor densidad de raíces característica de estos vegetales puede influir en los valores altos de COS. Mientras que suelos con coberturas más dispersas, como pastos naturales de las familias Asteraceae, Poaceae, Pteridophyta posiblemente aporten menor cantidad de biomasa subterránea al suelo y faciliten una mayor descomposición de materia orgánica (Zimmermann, 2010, Tonneijck y col., 2010).

Los valores de carbono en suelos de páramo son altos comparados, por ejemplo, con oxisoles bajo vegetación natural de sabana tropical denominada Cerrado, donde se almacenan 53 t C/ha a 30 cm de profundidad. Las bajas tasas de mineralización y de ciclaje de nutrientes en el páramo, ocasionadas por bajas temperaturas y alta humedad pueden favorecer una lenta descomposición de materia orgánica y la presencia de suelos negros y húmedos que almacenan altas tasas de carbono (Maia y col., 2010).

No obstante, la actividad antrópica en los ecosistemas andinos, cultivos y pastizales disminuye la cobertura natural y/o protección física del suelo y puede reducir significativamente los niveles de carbono orgánico en los mismos. Terrenos actualmente ocupados con pastos dedicados a ganadería extensiva y minifundios poseen menor contenido de COS, respecto a suelos con vegetación natural, debido a la ausencia de fertilización, combinada con altos niveles de erosión de los mismos (Dercon y col., 2007).

Las prácticas agrícolas, el uso de fertilizantes y los sistemas de cultivo son factores que controlan directa o indirectamente la estructura de las comunidades de microorganismos del suelo. Parámetros, como la biomasa microbiana, su actividad metabólica y el conteo de las poblaciones microbianas más importantes de la microbiota del suelo, son indicadores fundamentales de la calidad del suelo, siendo la biomasa microbiana, un indicador que refleja las respuestas al cambio ambiental, incluso, mejor que los parámetros físicos y químicos; no obstante, es difícil establecer indicadores de

calidad, que permitan estimar y cuantificar su nivel de eficacia, porque muchos cambios ocurren paulatinamente y, por lo tanto, las variaciones en la calidad del suelo se perciben cuando todos los efectos se combinan, al cabo de determinado tiempo (Falkowski et al. 2008; Cañón-Cortázar et al. 2012).

Los microorganismos identificados en este trabajo con fenotipo DFM⁺ pueden contribuir a la destoxificación de suelos contaminados del páramo andino, siendo útiles en procesos de biorremediación y conservación, permitiendo la degradación de contaminantes orgánicos, al mismo tiempo los aislados obtenidos en este trabajo con fenotipo DFM⁺ pueden considerarse candidatos para el desarrollo de inoculantes bacterianos como biofertilizantes, en este sentido los aislados con fenotipo DFM⁺ son una excelente alternativa para aumentar los niveles de fosfato biodisponibles, y de esta forma disminuir el uso de fertilizantes químicos manteniendo los rendimientos de los cultivos adecuados y la reducción de la contaminación agrícola.

En cuanto a las temperaturas de suelo analizadas; en el páramo de Piedras Blancas en las cumbres de la red GLORIA-Andes PI2 y MO6 muestran como en páramo desértico exhibe bajas temperaturas durante todo el año, y que las diferencias de temperaturas mínimas y máximas entre los meses no superan los 2 ó 3 °C. Sin embargo hay que destacar que existen amplias oscilaciones diarias de temperatura; esta amplitud térmica diaria observada es variable, puede estar alrededor de los 10 a 15 °C; lo que confiere condiciones ambientales de stress térmico permanente. En la época seca (Diciembre a Marzo) comparando las temperaturas mínimas y máximas, las fluctuaciones térmicas diarias llegaron a superar los 10 °C, representando el período térmico más desfavorable, altas temperaturas durante el día debido a la elevada radiación y temperaturas por debajo de 0 °C durante la noche. Esta condición es mucho más acentuada a nivel de suelo, tanto desnudo como protegido por vegetación.

Se demostró, que para las cumbres PI2 y MO6 durante la época húmeda (Abril a Noviembre) las variaciones de temperatura fueron menores. Las temperaturas inferiores a 0°C se observaron en la cumbre MO6 (figura 18); siendo frecuentes en cualquier época del año en este piso altiandino.

Una serie de observaciones, confirman que la temperatura ha aumentado, a escala global 0,6 °C y se espera que para el final del presente siglo la temperatura en el Norte de Sur América sea unos 2-4 °C más alta; representando una tasa de aumento cien veces mayor que la tasa natural luego del último máximo glacial. La tendencia de calentamiento en Venezuela ha estado asociada al rápido y sostenido retroceso de los glaciares en la Sierra Nevada de Mérida; dando así testimonio del aumento de las temperaturas (Llambí y col., 2013; Braun y Bezada, 2013). Estas predicciones sugieren que las poblaciones bacterianas tolerantes al frío en ambientes de alta montaña tropical, pueden sufrir importantes cambios. En términos generales se podría esperar un aumento en la proporción de poblaciones psicrotolerantes y disminución de poblaciones psicrófilas estrictas, dado el aumento de temperatura global esperado.

Los registros de temperatura analizados en este trabajo sugieren que el Páramo de Piedras Blancas exhibe una marcada estacionalidad hídrica, que repercute de manera evidente sobre la temperatura y que las especies presentes en este ecosistema poseen mecanismos de resistencia tanto a las temperaturas congelantes como a las oscilaciones diarias de temperatura que se presentan durante el día en este páramo altiandino. Esto se traduce a que poseen una amplia gama de adaptaciones que les permiten la tolerancia a dicho congelamiento, siendo estas adaptaciones exitosas a las condiciones climáticas del páramo. La presencia de bacterias en este ambiente es el mayor indicativo de que exhiben adaptaciones a las bajas temperaturas, demostrando la idea inicial, efectivamente el Páramo de Piedras Blancas está colonizado por bacterias psicrófilas y psicrotolerantes que presentan mecanismos y adaptaciones metabólicas al congelamiento, asegurando su supervivencia, lo que explica que poseen una amplia variedad de respuestas o características funcionales que permiten inferir una alta resiliencia y resistencia de los ensamblajes comunitarios del páramo bajo condiciones ambientales cambiantes, incluyendo el cambio climático global.

La proporción de microorganismos psicrófilos/psicrotolerantes determinados en esta investigación es clave, ya que estos pueden ser empleados a futuro como bioindicadores ante disturbios ecológicos, uno de ellos basado en las predicciones de incremento de temperatura sobre los Andes Tropicales, que podría alterar la densidad y riqueza de los microorganismos, puesto que el crecimiento de estos está estrechamente relacionado con la temperatura y la humedad. Estos dos factores influyen directamente en su metabolismo y reproducción, adicionalmente, puede haber un desequilibrio con el incremento de temperatura predicho para el ecosistema, ya que algunas especies se verán favorecidas como las psicrotolerantes mientras que otras como las psicrófilas se ven

perjudicadas con dichos cambios. La temperatura cumple un papel fundamental en el desarrollo de los microorganismos, ya que su actividad metabólica se inicia cuando se supera un determinado umbral térmico. Cuando la temperatura no es adecuada los microorganismos que se encuentran allí deben generar mecanismos de resistencia o permanecer en estados de latencia, lo cual impide que estos lleven adecuadamente sus funciones en el suelo, como por ejemplo la transformación de nutrientes.

Si se altera la estabilidad del ecosistema en el que se encuentran estos microorganismos, por disturbios son afectados en su densidad y actividad, lo que genera cambios en las interacciones que se producen sobre la materia orgánica y los nutrientes del suelo, disminuyendo características importantes como la fertilidad y la diversidad de especies que habitan allí. Esto conlleva a la pérdida de recursos no sólo ecológicos sino también económicos que afectan gravemente a las comunidades dependientes de este ecosistema.

Diversos reportes confirman que disturbios ecológicos como los incendios forestales producen cambios importantes en la estructura de los ecosistemas donde se presentan, dependiendo principalmente de la magnitud e intensidad con la que se hayan manifestado. Alteran de manera drástica las propiedades físicas, químicas y microbiológicas especialmente del suelo, lo que conlleva a la erosión y degradación de este, produciendo un desequilibrio general en todo el ecosistema (Vega, 2007). Para recuperar de alguna manera el estado original de estos ecosistemas se utilizan estrategias como la restauración ecológica, donde se busca imitar la estructura, diversidad, función y dinámica del ecosistema original que se quiere restaurar, implementando la introducción de algunas especies o simplemente monitoreando los cambios que sucedan cuando los impactos generados sean fáciles de superar (Gálvez, 2002; Vargas, 2007).

Estos ambientes andinos de alta montaña han sido reportados como puntos calientes de diversidad, principalmente debido a sus especies endémicas. Los ecosistemas de Páramos dentro de los Andes tropicales consisten en áreas aisladas y de gran elevación que, según se informa, son el punto caliente de biodiversidad de más rápida evolución en el mundo. Sin estos ecosistemas, la supervivencia de millones de habitantes estará en riesgo; los ecosistemas de alta montaña mantienen servicios ecosistémicos que benefician a las poblaciones humanas. Por ejemplo, el ecosistema de páramo andino almacena carbono orgánico en el suelo, también abastece y regula el agua. Estas funciones ecológicas mancomunadas propician la irrigación de cultivos, procesos industriales, generación de energía y agua para consumo doméstico de centros urbanos de Colombia, Venezuela, Perú y Ecuador (Buytaert y col., 2006). Sin embargo, este ecosistema se está degradando debido a la influencia de factores antrópicos. La intensificación agrícola, la explotación minera, la urbanización y el cambio climático (Buytaert y col., 2006; Marquis y col., 2012). La alteración del suelo por cambio de uso trae serias consecuencias socioeconómicas, incluyendo la desertificación, incremento de la pobreza y de conflictos (Ariza y col., 2013). Esta transformación tiene impacto significativo sobre el carbono secuestrado. Así que cuantificar carbono en páramos Venezolanos puede contribuir a definir prioridades de manejo de recursos naturales en este ecosistema y a incentivar proyectos que ayuden a la mitigación de carbono en ecosistemas de alta montaña.

En Venezuela se cuentan como muy pocas estaciones climáticas que permitan analizar la variabilidad interanual del clima de páramo; lo que representan un vacío importante en esta línea de investigación en el seguimiento diacrónico de largo plazo de los cambios en el clima y la vegetación en los Andes Venezolanos. Sin embargo, actualmente los patrones de repuesta al cambio climático global y los procesos reguladores en los cambios de los ecosistemas altiandinos de Venezuela están siendo explorados por la red GLORIA-Andes en el Estado Mérida, mediante el seguimiento in situ a largo plazo que analiza a gran escala los impactos ecológicos; así como también permita profundizar la investigación en diferentes aspectos multidisciplinarios para contar con una visión más integral del páramo y su dinámica, desarrollando así la capacidad de predicción de su respuesta en diversos escenarios de transformación, incluyendo el cambio climático global y diseñar e implementar estrategias más efectivas para garantizar la conservación del patrimonio que representa su espectacular biodiversidad y los ecosistémicos que dependen de su permanencia en el tiempo (Llambí y col., 2013; Llambí y Ramírez; 2017).

Este ecosistema en particular representa un ecosistema único para comunidades microbianas con habilidades diversas y distintivas para sobrevivir en condiciones consideradas extremas para otras formas de vida. Por ello es fundamental que se establezcan políticas de conservación en este ecosistema no intervenido, como las empleadas actualmente por la red GLORIA Andes Venezuela y la que aportamos con este trabajo mediante la preservación de los microorganismos aislados en este páramo objeto de estudio, con la iniciativa que se pueda explorar el potencial en biodiversidad que se

presenta en estas área, siendo una fuente de investigación única e importante que requiere de futuras investigaciones encaminadas al reconocimiento cuantitativo y cualitativo de la diversidad biológica, para ello es necesario el reconocimiento de la biodiversidad a nivel de especie, sobre todo para esta unidad ecológica que cuenta con una marcada diferencia gracias al gradiente altitudinal.

Una de las formas de contrarrestar los efectos del cambio climático son los procesos sociales, políticos y económicos que protejan y conserven tanto las condiciones ambientales del ecosistema como la calidad de vida de las comunidades que viven en el páramo altiandino. Es fundamental, protegerlos para ello es de suma importancia la divulgación de información y conocimiento sobre el vital ecosistema para el presente y futuras generaciones.

CONCLUSIONES

- Se aislaron bacterias psicrófilas/psicrotolerantes a partir de muestras de suelos provenientes de cumbres del Páramo de Piedras Blancas.
- Los medios agarizados R2A, LB y Malta fueron los medios más exitosos para el aislamiento de bacterias cultivables provenientes de suelo de alta montaña.
- Las morfologías celulares encontradas en bacterias provenientes de suelos de alta montaña, estuvieron representadas por bacilos cortos y cocobacilos.
- Los aislados bacterianos estudiados muestran altos porcentajes de resistencia y multiresistencia a antibióticos y metales pesados.
- De las enzimas ensayadas las más abundantes activas a bajas temperaturas fueron las proteasas, catalasas y oxidasas
- El medio selectivo NBRIP permitió determinar que 38,77% de los aislados de PI2 y que un 40,81% de los aislados de MO6 tiene actividad DFM⁺.
- 14 aislados fueron capaces de inhibir al fitopatógeno *Pythium ultimum* de modo que pueden estar ejerciendo actividades de biocontrol en el suelo.
- El sistema de purificación minipreps permitió detectar la presencia de plásmidos en aislados de suelo de alta montaña.
- En el Páramo de Piedras Blancas la amplitud térmica diaria analizada en las cumbres PI2 y MO6 a lo largo del año resulta muy variable, lo que confiere condiciones ambientales de stress térmico permanente en cualquier época de año.
- El Porcentaje de MOS disminuye significativamente con respecto a la altitud pudiendo esto explicar las diferencias de abundancias de plantas y microorganismos a diferentes altitudes en la alta montaña tropical.
- La presencia de los microorganismos del suelo podría estar relacionada con la productividad, diversidad y composición de las comunidades vegetales.

PERSPECTIVAS

- Caracterizar a nivel molecular los aislados para tener identificación precisa y su ubicación filogenética.
- Determinar los niveles de producción y si estos son importantes purificar y caracterizar las enzimas activas a bajas temperaturas.
- Las técnicas independientes de cultivo como la metagenómica, podrían ampliar el conocimiento de la diversidad existente en las comunidades microbianas de alta montaña.
- Aislar y caracterizar a nivel molecular los plásmidos encontrados en los aislados estudiados.
- Detectar el gen que codifica para la enzima glucosa deshidrogenasa en los aislados con actividad DFM⁺
- Aislar grupos funcionales de bacterias como las nitrificantes, desnitrificantes y fijadoras de N.
- Realizar estudios *in vitro* con una planta modelo para verificar si los aislados estudiados tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal y por lo tanto explorar su potencial como posibles biofertilizantes a bajas temperaturas.
- Se sugiere evaluar variables fisicoquímicas en las cumbres PI2 y MO6, como humedad relativa.
- Realizar una correlación para darle fundamento estadístico a la tendencia observada con los microorganismos y la MOS en las cumbres estudiadas PI2 y MO6.

BIBLIOGRAFÍA

- Aislabie J, Paul A. Broady y David J. (2006). Culturable aerobic heterotrophic bacteria from high altitude, high latitude soil of La Gorce Mountains (86°30'S, 147°W), Antarctica. *Antarctic Science* 18 (3), 313–321 (2006)©Antarctic Science Ltd Printed in the UK DOI: 10.1017/S0954102006000368.
- Atlas M, Bartha R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Segunda edición. Editorial Addison Wesley. Madrid, España. 217-218.
- Azócar A y Rada F. 2006. *Ecofisiología de Plantas de Páramo*. Instituto de Ciencias Ambientales y Ecológicas. Facultad de Ciencias. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.
- Ataroff, M. y Sarmiento, L. 2004. Las unidades ecológicas de los Andes de Venezuela. En: La Marca, E., Soriano, P. (eds). *Reptiles de Los Andes de Venezuela*. Fundación Polar, Codepre-ULA, Fundacite-Mérida. Biogeos: 9-26.
- Abyzov S, Poglazova MN, Mitskevich, Ivanov MV. (2005). Common features of microorganisms in ancient layers of the Antarctic ice sheet. In: Castello JD, Rogers SO, editors. *Life in ancient ice*. Princeton Univ Press Princeton NJ, 2005; p. 240-50.
- Alvizu P. (2004). Complejidad y respuesta funcional de la vegetación de páramo a lo largo de gradientes altitudinales. Tesis Doctoral. Postgrado en ecología tropical. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela. 115p.
- Barlow M, Reik R, Jacobs S, Medina M, Meyer M, McGowam J, Tenover F. (2008). High rate of mobilization for blaCTX-Ms. *Emerg Infect Dis* 14:423-428.
- Balcazar, W., Rondón, J., Rengifo, M., Ball, M., Melfo, A., Gómez, W., and Yarzabal, L.A. (2015). Bioprospecting glacial ice for plant growth promoting bacteria. *Microbiol. Res.* 177: 1-7.
- Bashan Y, Kamnev AA, de-Bashan LE. 2013. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biology and fertility of soils* 49(4): 465-479.
- Benavides G y Hermida A. (2008). Aislamiento e identificación de flora bacteriana nativa del suelo de los Páramos Cruz Verde y Guasca. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C., 2008, 1-118p.
- Beltrán P. (2014). Hongos solubilizadores de fosfato en suelo de páramo cultivado con papa (*Solanum tuberosum*). *Revista Ciencia en Desarrollo*, Vol. 5 No. 2 ISSN 0121-7488. 2014, pp. 145-154.
- Belliveau B, Staradub M y Trevor J. (1991). Occurrence of antibiotic and metal resistance and plasmids in *Bacillus* strains isolated from marine sediment. *Can. J. Microbiol.* 37, 5:13-520.
- Brock TD, Freeze H. (1969). *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J. Bacteriol.* 98(1):289-97.
- Bobadilla, C. (2008). Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2008, 1-97p.
- Braun C y Bezada M (2013). The History and Disappearance of Glaciers in Venezuela. *Journal of Latin American Geography*, 12 (2), 2013 © Conference of Latin Americanist Geographers.
- Buck JD. (1982). Nonstaining (KOH) method for determination of gram reactions of marine bacteria. *Applied Environ Microbiol* 44(4): 992-993.
- Braun C y Bezada M (2013). The History and Disappearance of Glaciers in Venezuela. *Journal of Latin American Geography*, 12 (2), 2013 © Conference of Latin Americanist Geographers.
- Canganella F y Wiegel. (2011). Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. *Naturwissenschaften*. 98(4):253-79.
- Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(6):2227-2238.
- Carrillo, L. (2003). *Microbiología agrícola*. Guía biológica de la Universidad de Salta, Patagonia-Argentina, 2003, 28 p.
- Chattopadhyay MK. (2006). Mechanism of bacterial adaptation to low temperature. *J. Biosci.* 31(1):157-65.
- Cavicchioli R, Siddiqui K, Andrews D y Sowers K. (2002). Low-temperature extremophiles and their applications. *Current Opin. in BIOTEC.* 13:253-261.
- Cayol J, Ollivier B, Alazard D, Amils R, Godfroy A, Piette F, Prieur, D. (2015). The Extreme Conditions of Life on the Planet and Exobiology. *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications*. Springer Netherlands, (10) 353-394.
- Chul H, Song H, Kil Y, Baik H, Yong H, Bon S, Young C. (2003). Cloning and expression of pyrroloquinoline quinone (PQQ) genes from a phosphate-solubilizing bacterium *Enterobacter intermedius*. *Curr. Microbiol.* 47:457–461.
- Coyne M. (2000). *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. 440 págs. Editorial S.A. Ediciones Paraninfo.
- Cole CV, Heli RD. (1981). Phosphorus effects on terrestrial nitrogen cycling. En: F. E. Clark and T. Rosswall (Eds). *Terrestrial Nitrogen Cycle. Processes, Ecosystem and Management Impact.*, *Ecol. Bull. (Stockholm)* 33:363-374.
- Cleland E, Chuine I, Menzel A, Mooney A, Schwartz D. (2007). Shifting plant phenology in response to global change. *Trends in Ecology and Evolution* 22:357-365.
- Das K, Katiyar V, Goel R. 2003. 'P' solubilization potential of plant growth promoting *Pseudomonas* mutants at low temperature. *Microbiological Res.* 158 (4): 359–362.
- De Maayer P, Anderson D, Cary C, Cowan DA. 2014. Some like it cold: understanding the survival strategies of psychrophiles. *EMBO Reports* 15(5): 508-517.
- Dercon, G., Govers, G., Poesen, J., Rombaut, K., Vandenbroeck, E., Sánchez, H., Loaiza, G., & Deckers, J., Animal-powered tillage erosion assessment in the Southern Andes region of Ecuador. In: *Geomorphology*, 2007, 87, 4–15.
- Díaz MIR, García JC, Vargas E, Cervantes C. 2006. Mecanismos bacterianos de tolerancia al cromo. *Ciencia Nicolaita*, 42.
- Duillo A, Tutino M, Marino G. (2004). Recombinant protein production in Antarctic gram negative bacteria. *Methods Mol Biol* 267:225-237.
- D'Amico S, Collins T, Marx JC, Feller G, Gerday C. (2006). Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Reports* 7(4): 385-389.
- Feller G, Gerday C. (2003). Psychrophilic Enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nat Rev Microbiol.* 2003;1(3):200-8.

- Franks F. (1995). Protein desestabilization at low temperatures. *Adv. Protein Chem.* 46, 105-139.
- Flores R.(2010). Estudio poblacional de oomicetos aislados de suelo hortícola en tepetitla TLAX.Centro de Investigaciones en biotecnología aplicada Futuyima, D (1998) *Evolutionary Biology*. Third edition, Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.
- Garriety, Brenner, Krieg, Noel, Staley, James R.** (2005). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. 1203p.
- Gaston, K (2003). *The structure and dynamics of geographic ranges*. Oxford University Press.
- Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M, Chessa J, Claverie P, Collins T, D'Amico S, Dumont J, Garsoux G, Georlette D. (2000). Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. Review focusing on mechanisms of enzyme adaptation and how these properties may be exploited in biotechnology. *Trends. Biotech.* 18:103-107.
- Gimenez V. 1984. *Bol. Serv. Plagas*, 10: 257-298, 1984
- Goldstein A. (1995). Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram negative bacteria. *Biological Agriculture and Horticulture* 12(1): 185-193.
- Goldstein A. (2000). Bioprocessing of rock phosphate ore: essential technical considerations for the development of a successful commercial technology, *Proceedings of the 4th International Fertilizer Association Technical Conference, IFA, Paris*.
- Gross M. (2001) *Life on the Edge. Amazing creatures thriving in extreme environments*, pp. 1-11. Plenum Press, New York.
- Harley J, Smith SE. (1983). *Mycorrhizal symbiosis*. London, New York: Academic Press.
- Helmke E, Weyland R, Brinkmayer R, Knittel K, Ruegens H, Amann R. (2003). Diversity and community structure of bacterial communities in Arctic versus Antarctic sea ice. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 6610-6619.
- Heddle J y Maxwell A. (2002). Quinolone-Binding Pocket of DNA Gyrase: Role of GyrB. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46,6:1805-1815.
- Heuer H y Smalla K, (2012). Plasmids foster diversification and adaptation of bacterial populations in soil. Institute for Epidemiology and Pathogen Diagnostics, Julius Kühn-Institut-Federal Research Centre for Cultivated Plants (JKI), Braunschweig, Germany. DOI: 10.1111/j.15746976.2012.00337.x
- Heijden M, Bardgett R y Straalen N. (2006). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, (2008) .doi 11: 296-310 doi: 10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x
- Hiradate S, Ma JF, Matsumoto H. (2007). Strategies of plants to adapt to mineral stresses in problem soils. *Adv. Agron.* 96:65-132
- Horikoshi, K., Bull A. 2011. *Extremophiles Handbook*. 6: 756 pp.
- Hoyoux A, Jennes I, Dubois P, Genicot S, Dubail F, François J, Baise E, Feller G, Gerday C. (2001). Cold-adapted β -galactosidase from the Antarctic psychrophiles *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Appl Environ Microbiol.* 67(4):1529-35.
- Hocking PJ. (2001). Organic acids exuded from roots in phosphorus uptake and aluminum tolerance of plants in acid soils. *Adv. Agron.* 74:63-97.
- Igual J, Valverde A, Cervantes E, Velázquez E. (2001). Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomie* 21:561-568.
- Illmer P, Schinner F. (1995). Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* 27(3):257-263.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2013: Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1535 pp.
- Ji G y Silver S. (1995). Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern. *J. Ind. Microbiol.* 14:61-75.
- Johns GC y Somero GN. (2004). Evolutionary convergence in adaptation of proteins to temperature: A 4-lactate dehydrogenases of Pacific damselfishes (*Chromis* spp.). *Mol Biol Evol.* 21(2):314-20.
- Joshi S y Satyanarayana T. (2013). *Biotechnology of Cold-Active Proteases*. *Biology*, 2:755-783.
- Kamilova F, Kravchenko LV, Shaposhnikov AI, Azarova T, Makarova N, Lugtenberg B. (2006). Organic acids, sugars, and L-tryptophan in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19(3): 250-256.
- Kattan, G. H., Franco, P., Rojas, V. y Morales, G. (2004). Biological diversification in a complex region: a spatial analysis of faunistic diversity and biogeography of the Andes of Colombia. *Journal of Biogeography* 31:1829-1839. Kay, C. 2006.
- Katiyar V y Goel R. (2003). Solubilization of inorganic phosphate and plant growth promotion by cold tolerant mutants of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiol Res* 158(2): 163-168.
- Katiyar V y Goel R. (2004). Siderophore mediated plant growth promotion at low temperature by mutant of fluorescent pseudomonad. *Plant Growth Regulation* 42(3): 239-244.
- Kennedy AC. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agr Ecosyst Environ*, 74 (1): 65-76
- Kim KY, Hwangbo H, Kim YW, Kim HJ, Park KH, Kim YC, Seoung KY. (2002). Organic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedium* 60-2G. *Korean J. Soil Sci. Fer* 35: 59-67.
- Kotchoni S, Gachomo E, Betiku E, Shonukan O. (2003). A home made kit for plasmid DNA mini-preparation. *African Journal of Biotechnology* 2(4): 88-90.
- Koneman E, Washington C, Stephen D, Gary W. (2005). *Koneman, diagnóstico microbiológico, texto y atlas en color*. Sexta edición, Editorial Médica Panamericana; 1695 páginas.
- Koch L. (1996). What size should a bacterium be? a question of scale. Department of Biology, Indiana University, Bloomington, Indiana, 47405-6801. *Annu. Rev. Microbiol.* 1996. 50:317-48
- Kumar V, Singh P, Jorquera MA, Sangwan P, Kumar P, Verma AK, Agrawal S. (2013). Isolation of phytase-producing bacteria from Himalayan soils and their effect on growth and phosphorus uptake of Indian mustard (*Brassica juncea*). *World J Microbiol and Biotechnol* 29(8): 1361-1369.
- Llambí L, Sarmiento A, Rada F. (2013). La evolución de la investigación ecológica en los páramos de Venezuela: múltiples visiones de un ecosistema único. En Medina E, Huber O, Nassar JM (Eds). *Recorriendo el paisaje vegetal de Venezuela*. Ediciones IVIC, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Caracas, Venezuela. Pp 173-209.
- Llambí L y Ramírez L. 2017. Consolidación de los sitios de trabajo en Venezuela de la Red Gloria-Andes. CONDESAN – ICAE.
- Lipson DA (2007). Relationships between temperature responses and bacterial community structure along seasonal and altitudinal gradients. *FEMS Microbiol Ecol* 59: 418-427.
- MacElroy RD. (1974). Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems*. 6(1):74-5.

- Margesin R. (2009). Effect of temperature on growth parameters of psychrophilic bacteria and yeasts. *Extremophiles* 13(2): 257-262.
- Mavingui P, Combes C, Normand P, Steinberg C. (2015). Microorganisms and Biotic Interactions. In : J.-C. Bertrand, P. Caumette, P. Lebaron, R. Matheron, P. Normand, Sime-Ngando, T., *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications*. : Springer Netherlands 2015. 395-444
- Maia, S. M., Ogle, S. M., Cerri, C. C., & Cerri, C. E. Changes in soil organic carbon storage under different agricultural management systems in the Southwest Amazon Region of Brazil. In: *Soil and Tillage Research*. 2010, 106 (2), 177-184.
- Miller R, Gammon K y Martin J. (2009). Antibiotic resistance among bacteria isolated from seawater and penguin fecal collecte near Palmer Station, Antar. *Can.J.Microbiol.* 55(1):37-45.
- Miller SH, Browne P, Prigent-Combaret C, Combes-Meynet E, Morrissey JP, O'gara F. 2010. Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology Reports* 2(3): 403-411.
- Mishra PK, Joshi P, Bisht SC, Bisht JK, Selvakumar G. 2010. Cold tolerant agriculturally important microorganisms. En: Maheshwari DK (ed) *Plant growth and health promoting bacteria, microbiology monographs*. Springer, Berlin, pp 273–296.
- Monasterio, M. (1980). Las formaciones Vegetales de los páramos de Venezuela. En M. Monasterio (Ed). *Estudios Ecológicos en los Páramos Andinos*. Ediciones de la Universidad de los Andes. Mérida Venezuela. pp. 93-158.
- Morita RY. (1975). Psychrophilic bacteria. *Bacteriological Reviews* 39(2): 144.
- Morin P (1999). Community ecology. Malden, MA: Blackwell Science, Inc. Moritz, C. Patton, C. J. Conroy, J. L. Parra, G. C. White y S. R. Beissinger. 2008. Impact of a century of climate change on small-mammal communities in Yosemite National Park, USA. *Science* 322:261-264
- Moyer, C. L. y Morita, R. Y. (2007). Psychrophiles and psychrotrophs *Encyclopedia of life sciences*
- Navarro S y Navarro G. (2000). *Química Agrícola. El suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal*. Editorial Mundi-Prensa. Madrid. Pág. 15-16.
- Nautiyal SC. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170: 265-270.
- Nogales B. (2005). Ecosistemas Revista Científica y técnica de ecología y medio ambiente. La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: Descubriendo la punta del iceberg. El suelo como hábitat para los microorganismos. *Ecosistemas*. Vol 14, n.2
- Nunan, N., Wu, K., Young, I. M., Crawford, J. W. y Ritz, K. 2003. Spatial distribution of bacterial communities and their relationships with the micro-structure of soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44(2): 203-215.
- Ochman H, Lawrence J, Groisman E. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*. 405(6784):299-304.
- Pauli, H.; Gottfried, M.; Lamprecht, A.; Niessner, S.; Rumpf, S.; Winkler, M.; Steinbauer, K. & Grabherr, G., coordinadores y editores (2015): *Manual para el trabajo de campo del proyecto GLORIA. Aproximación al estudio de las cimas. Métodos básico, complementarios y adicionales*. 5ª edición. GLORIA-Coordinación, Academia Austriaca de Ciencias y Universidad de Recursos Naturales y Ciencias de la Vida, Viena, Austria. Edición en español a cargo de Benito, J. L. & Villar, L., Jaca, España, 148 pp.
- Patino Carlos y Sanclemente Oscar. (2014). Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. *Entramado*, vol. 10, núm. 2, julio-diciembre, 2014, pp. 288-297 Universidad Libre Cali, Colombia
- Pandey A, Trivedi P, Kumar B, Palni LMS. 2006. Characterization of a phosphate solubilizing and antagonistic strain of *Pseudomonas putida* (B0) isolated from a sub-alpine location in the Indian Central Himalaya. *Current Microbiology* 53(2): 102-107.
- Parmesan C. (2006). Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 37:637-669.
- Pérez, F. L. 1987. Needle-ice activity and the distribution of stem-rossette species in a venezuelan paramo. *Arctic and Alpine Research*, Vol. 19, 2. 135-153
- Pérez, F. L. (1991). Soil moisture and the distribution of giant Andean rosettes on talus slopes of a desert paramo. *Climate Research*. 1: 217-231.
- Pérez, F. L. (1995). Plant-induced spatial patterns of surface soil properties near caulescent Andean rosettes. *Geoderma* 68(1-2): 101-121.
- Petrova M, Gorlenko Z, Mindlin S. (2009). Molecular structure and translocation of a multiple antibiotic resistance region of a *Psychrobacter psychrophilus* permafrost strain. *FEMS Microbiology Letters* 296(2): 190-197.
- Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, van der Putten WH. 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology* 11(11): 789-799.
- Ramírez A, García E, Longa A, Sánchez K, Nieves M, Velasco Judith. (2006) *Manual práctico de bacteriología general*. Publicaciones vicerrectorado académico. Editorial Venezolana, C.A. 203 páginas.
- Ramírez N, Serrano J, Sandoval H. (2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México *Cienc Farm.* 2006;37(3):56-71
- Ramírez, L. Rada, F. y Llambí, L. D. 2015. Linking patterns and processes through ecosystem engineering: effects of shrubs on microhabitat and water status of associated plants in the high tropical Andes. *Plant Ecology*. 216(2):213-225.

- Ramli A., Azhar M, Shamsir M, Rabu A, Murad A., Mahadi N , Illias, R. (2013). Sequence and structural investigation of a novel psychrophilic α -amylase from *Glaciozyma antarctica* PI12 for cold-adaptation analysis. *Journal of Molecular Modeling*, 19(8), pp.3369–3383.
- Rime T, Hartmann M, Brunner I, Widmer F, Zeyer J, Frey B.(2014). Vertical distribution of the soil microbiota along a successional gradient in a glacier forefield. doi: 10.1111/mec.13051
- Ricklefs R y Miller L.(2000). *Ecology*. Fourth edition. New York: W.H. Freeman and Company.
- Rondón J, Gómez W, Ball M, Melfo A, Rengifo M, Balcázar W, Dávila-Vera D, Balza A, Mendoza RV, Yarzabal L. (2016) Diversity of culturable bacteria recovered from Pico Bolívar's glacial and subglacial environments, at 4950 m, in Venezuelan tropical Andes. *Can J Microbiol*. 62(11):904-917.
- Rodríguez H y Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* Volume 17, Issues 4–5, Pages 319-339.
- Rodríguez H, Fraga R, González T, Bashan Y. (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil* 287:15-21.
- Rodríguez DF, Tiedje JM.(2008). Coping with our cold planet. *Appl Environ Microbiol*. 74(6):1677-86.
- Roper, M.y Ophel-Keller, K., 1997. Soil microflora as bioindicators of soil health. In: Pankhurst, C.E., Doube, B.M. & Gupta, V.V.S.R. (eds). *Biological indicators of soil health*. CAB International, Wallingford, England. pp. 157-177.
- Rothschild LJ y Mancinelli RL. 2001. Life in extreme environments. *Nature* 409(6823): 1092-1101.
- Root, T., Price, J., Hall, K., Schneider, S., Rosenzweig, C y Pounds, A. 2003. Fingerprints of global warming on wild animals and plant. *Nature*. 421. 57-60.
- Russel NJ, Harrison P, Johnston IA, Jaenicke R,Zuber M, Franks F,Wynn-Williams D.(1990).Cold adaptation of microorganisms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*.326(1237):595-611.
- Russel NJ.(2000).Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles.*Extremophiles*;4(2):83-90.
- Sáenz D. Efecto de un incendio forestal sobre grupos funcionales bacterianos edáficos en una plantación de *Eucalyptus cinerea* (Suesca-Cundinamarca). Trabajo de grado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C. 2006, 75p.
- Sarmiento G. (1986).Los principales Gradientes ecológicos en los Andes Tropicales. En: Simposio.Ecología de Tierras Altas. Anuales del IV Congreso Latinoamericano de Botánica. Bogotá. Pp 47-64
- Schumacher B. (2002).Methods for the determination of total organic carbon (TOC) in soils and sediments. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Stevenson FJ. (2005). *Cycles of soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients*. Wiley, New York.
- Selvakumar G, Kundu S, Joshi P, Nazim S, Gupta AD, Mishra P, Gupta KHS. 2008. Characterization of a cold-tolerant plant growth-promoting bacterium *Pantoea dispersa* 1A isolated from a sub-alpine soil in the North Western Indian Himalayas. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24(7): 955–960.
- Selvakumar G, Joshi P, Nazim S, Mishra P, Bisht J, Gupta H. (2009). Phosphate solubilization and growth promotion by *Pseudomonas fragi* CS11RH1 (MTCC 8984), a psychrotolerant bacterium isolated from a high altitude Himalayan rhizosphere. *Biology* 64(2): 239–245.
- Sexton J, McIntyre A, Angert L, Rice J (2009).Evolution and ecology of species limits annual review of Ecology and Systematics 40:415-436
- Simon C, Wiezer A, Strittmatter AW, Daniel R.(2009). Phylogenetic diversity and metabolic potential revealed in a glacier ice metagenome. *Appl Environ Microbiol*.75(23):7519-26.
- Siddiqui K y Cavicchioli R. (2006) .Cold-adapted enzymes.*Annu Rev Biochem*.75:403-33.
- Smibert M y Krieg N.(1994).Phenotypic characterization. In *Methods for general and molecular bacteriology* / Gerhardt P. editor-in-chief ; R.G.E. Murray, Willis A. Wood, Noel R. Krieg, [editors]. ASM Press, Washington,DC. P.607-54
- Sudha A, Augustine N, Thomas S.(2013). Emergence of multi-drug resistant bacteria in the Arctic, 79°N. *J Cell Life Sci*.2013;1(1):1-5.
- Summers AO.(2002).Generally overlooked fundamentals of bacterial genetics and ecology.*Clin Infect Dis*.2002;34(3):S85-S92.
- Satyanarayana T, Raghukumar C, Shivaji S.(2005). Extremophilic Microbes: Diversity and Perspectives.*Curr Sci India*.89:78-90.
- Struvay C y Feller G.(2012).Optimization to low temperature activity in Psychrophilic enzymes.*Int J Mol Sci*.13:11643-11665.
- STolbovoy V, Montanarella L, Filippi N, Jones A, Gallego J, Grassi G.2007. Soil Sampling Protocol to Certify the Changes of Organic Carbon Stock in Mineral Soil of the European Union. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- Tafur J, Torres J, Villegas M.(2008).Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias gram negativas. Centro internacional de entrenamiento e investigaciones Médicas, CIDEIM, Cali, Colombia. Volumen 12 No 3.
- Tanaka y col.,2014**
- Torres, M; Lizarazo, L. (2006). Evaluación de grupos funcionales (Ciclo del C, N, P) y actividad de fosfatasa ácida en dos suelos agrícolas del departamento de Boyacá. *Agronomía Colombiana*; 24(2) 317-325.
- Torres F (2003). Estructura y función nictinástica de la vaina foliar de *Coespeletia cuatrec.* *Plantula* 3 (2):88-99.
- Torsvik V, ØvreåsL. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 2002, 5(3):240–245.
- Tonneijck, F. H., Jansen, B., Nierop, K. G. J., Verstraten, J. M., Sevink, J. & DE Lange, L. Towards understanding of carbon stocks and stabilization in volcanic ash soils in natural Andean ecosystems of northern Ecuador. In: *European Journal of Soil Science*. 2010, 61, 392–405.
- Thomas C, Nielsen K. (2005).Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria.*Nat.Rev.Microbiol*.3(9):711-721.
- Trivedi P y Sa T. (2008). *Pseudomonas corrugata* (NRRL B-30409) Mutants increased Phosphate Solubilization, Organic Acid Production, and Plant growth at lower temperatures. *Current Microbiology* 56(2): 140–144.
- Uribe D; Sánchez N, Vanegas J. Role of Microbial biofertilizers in the development of a sustainable agriculture in the tropics. In: *Soil biology and agriculture in the tropics*. Soil Biology 21, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2010. p. 235-250.
- Uchida M, Nakatsubo T, Kasai Y, Nakane K & Horikoshi T (2000). Altitudinal differences in organic matter mass loss and fungal biomass in a subalpine coniferous forest, Mt. Fuji, Japan. *Arct Antarct Alp Res* 32: 262–269.
- Van Schaik C, Terborgh W y Wright J.(1993).The phenology of tropical forests: adaptive significance and consequences for primary consumers. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24:353.377.
- Vargas, O. (1997). Un modelo de sucesión regeneración de los páramos después de quemadas. *Caldasia*; 19(1-2): 331–345.
- Vincent WF. (2000). Cyanobacterial dominance in the polar regions. En: Whitton BA and Potts M (eds.) *Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*.Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 321-340.

- Wakatsuki T. (1995).Metal oxido-reduction by microbial cells.J.Ind.Microbiol.14, 169-177.
- Wang W, Sun M, Liu W y Zhang B.(2008). Purification and characterization of a psychrophilic catalase from Antarctic *Bacillus*.Marine Products and Enzyme Engineering Laboratory, Yellow Sea Fisheries Research Nanjing Road, Qingdao, Shandong Province,China.Can J. Microbiol.54:823-828 (2008).
- Widdel F.(2007).Theory and measurement of bacterial growth. Di dalam Grund praktikum Mikrobiologie, 4
- Wolosowska S y Synowiecki J .(2004).Thermostable β -glucosidase with a broad substrate specifity suitable for processing of lactose-containg products.Food Chem.2004;85(2):181-7.
- Wright GD y Poinar H.(2012).Antibiotic resistance is ancient: implications for drug discovery.Trends Microbiol.2012;20(4):157-9.
- YI, Yanmei; HUANG, Weiyi and GE, Ying. Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. In: World J. Microbiol. Biotechnol., 2008. p. 1059- 1065.
- Zhao D, Zi-Chao Y, Ping-Yi L,Zhao-Yu W,Xiu-Lan C,Mei S, Yong Y,Bo C,Bai-Cheng Z,Yu-Zhong Z.(2011).Characterization of a cryptic plasmid Psm429 and its application for heterologous expression in psychrophilic *Pseudoalteromonas*. Microbial Cell Fact.10:30.
- Zhang S, Sun M, Li T, Wang Q,Hao J. (2011).Structure analysis of a new psychrophilic marine protease.Plos ONE, 6:e26939. Doi:10.1371/journal.pone.0026939.
- Zimmermann, M., Meir, P., Silman, M. R., Fedders, A., Gibbon, A., Malhi, Y. & Zamora, F. No differences in soil carbon stocks across the tree line in the Peruvian Andes. In: Ecosystems. 2010, 13 (1), 62-74.
- Zitnick K, Jack A, del Río M, Fortuna A, Berlin D. Nelson Jr.(2017). Probability Models Based on Soil Properties for Predicting Presence-Absence of *Pythium* in Soybean Roots. Microb Ecol DOI 10.1007/s00248-017-0958-2

www.bdigital.ula.ve

ANEXOS

ANEXO 1

MEDIOS DE CULTIVO

COMPOSICIÓN DEL MEDIO R2A:

- Peptona 0,5g/L.
- Casaminoácidos 0,5g/L
- Dextrosa/Xilosa 0,5g/L
- Almidón soluble 0,5g/L
- Fosfato de potasio dibásico 0,3g/L
- Sulfato de Magnesio 0,05 g/L
- Piruvato de Sodio 0,3g/L

COMPOSICIÓN DEL MEDIO LB:

- Triptona 10g/L
- Extracto de levadura 5g/L

- NaCl 5g/L
- Agar 20 g/L

COMPOSICIÓN DEL MEDIO AGAR MALTA

- Extracto de Malta 10 g/L
- Agar 20 g/L

COMPOSICIÓN DEL MEDIO PAPA DEXTROSA

- Papa dextrosa Agar 39 g/L

COMPOSICIÓN DEL MEDIO PAPA ZANAHORIA

- Papa 20 g/L
- Zanahoria 20 g/L
- Agar 20 g/L

Nota: lavar la papa y la zanahoria, quitar la concha y luego picar en pedacitos pequeños y pesar.

COMPOSICIÓN DEL MEDIO AGAR LECHE

- Leche descremada 10 g
- Extracto de levadura 10 g
- Agar 20 g/L

Las concentraciones indicadas se utilizan para preparar 1L de medio en 1L de agua destilada.

COMPOSICIÓN DEL MEDIO AGAR ALMIDÓN

- Agar Papa Dextrosa 19,5 g
- Almidón 2,5 g

(Para preparar 500ml) y añadir 500 ml de agua destilada y esterilizar

Nota: el medio se coloca en autoclave y al obtener una presión de 15 kPa se deja 10 min.

COMPOSICIÓN DEL MEDIO NBRIP (NAUTIYAL, 1999).

- Sales 5X 200mL
- Glucosa 20% 50mL
- Agar 2X 500mL
- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 10X 10 g/l 100mL

Agua c.s.p. 1000 ml. Ajustar a pH 7,0 con NaOH diluido

Sales 5X: $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (25 g); $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1,16 g); KCl (1 g); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,50 g); agua c.s.p. 1000 ml.

COMPOSICIÓN DEL MEDIO AGAR MACCONKEY

- MacConkey agar 50 gr en 1L de agua destilada, agitar y esterilizar

COMPOSICIÓN DEL MEDIO AGAR NUTRITIVO

- Agar nutritivo 23 gr en 1L de agua destilada, agitar y esterilizar

ANEXO 2

BATERÍA BIOQUÍMICA PARA ENTEROBACTERIAS

CALDO NUTRITIVO

- 29 gr de Tioglicolato para 1L de agua destilada, Esterilizar y refrigerar a 4°C hasta su posterior uso.
- **Tubo 1 PPPA**

Phenylalanine agar 5,7 gr, agua 250 ml, se hierve y se envasa en tubo 16x150. Se lleva al auto clave por 15 min se inclina con taco y bisel.

- **Tubo 2 Triptona Indol**

NaCl 1,5 gr al 0,5%, 250 de agua destilada 2,5 gr Triptona, se envasa en tubos de ensayo y se lleva al autoclave por 15 min

- **Tubo 3 de Dungel** para 250ml agua destilada son 4 gr de base 2,5 de glucosa pH 7,4

- **Tubo 4 Lisina, 5 Ornitina Y 33 LOA (Control)**

Base moeller decarboxylase broth base, se agrega el aminoácido correspondiente (4 y 5) y el 33 es solo la base sin aminoácidos. 250 ml de agua destilada. Base 2,6 gr, Aminoácido 2,5 gr

- **Tubo 6 Motilidad**

Se pesa de acuerdo al envase Agar motilidad, se envasa con taco de un dedo y se lleva al autoclave se calienta casi que hirviendo y se envasa

- **Tubo 7 lactosa** base 4gr, agua destilada 250gr; 2,5 lactosa

- **Tubo 8 Citrato de Simons**

Cloruro de Sodio 5gr; Fosfato dipotasico 1gr, Citrato de Sodio 2 gr; Sulfato de Magnesio 0,2gr; agar 15gr; azul de bromotimol 0,08gr; Suspender los componentes en 1L de agua destilada; calentar hasta ebullición, envasar en tubos, esterilizar a 121 °C, por 15 minutos.

- **Tubo 9 Ramnosa** base 4 gr agua destilada 250ml 2,5 ramnosa

- **Tubo 22 Urea** pectona 1gr , dextroza 1gr

Cloruro de sodio 5gr; fosfato monopotásico 2gr; Rojo de fenol 0,012gr; Agar puro 15gr; Urea 20gr. Disolvemos todos los componentes en 1L de agua destilada para luego colocarlo a hervir (se deja unos 20 cc del agua para la urea por filtración después de hervir esterilizamos a 121 C por 15 minutos, se deja reposar el medio , agregamos la urea estéril por filtración envasamos en tubos estériles 13x100 e inclinamos , se agrega 5cc de urea ya estéril ph7

- Tubo 32 caldo nitrato 9gr en 1 litro de agua destilada
- Tubo 47 Kligler, 52 gr de kligler Iron agar en 1000ml de agua destilada

Tabla 1. Lectura e Interpretación para el agar Kligler (Ramírez y col., 2006)

Lectura				Interpretación
L	G	Gas	H ₂ S	
K	K	-	-	No fermenta ni la lactosa ni la glucosa y no produce gas ni H ₂ S
A	A	-	-	fermenta la lactosa y la glucosa y no produce gas ni H ₂ S
A	A	+	-	fermenta la lactosa y la glucosa, produce gas y no produce H ₂ S
K	A	-	-	No fermenta la lactosa pero si la glucosa, no produce gas ni H ₂ S
K	A	+	-	No fermenta la lactosa pero si la glucosa y no produce gas ni H ₂ S
K	A	-	+	No fermenta la lactosa pero si la glucosa y no produce gas y produce H ₂ S
K	A	+	+	No fermenta la lactosa pero si la glucosa, produce gas y H ₂ S

* L= Lactosa; G= Glucosa; K= Alcalino A= ácido (amarillo), + = Positivo; - = Negativo

ANEXO 3

Tabla 2. Evaluación cualitativa del crecimiento de los aislados a diferentes temperaturas

- ✓ Rango de crecimiento 10-30°C, se Observó Crecimiento a 10, 20 y 30°C
- ✓ Rango de crecimiento 10-20°C, solo se Observó Crecimiento a 10 y 20°C

Aislado	Rango de crecimiento	Aislado	Rango de crecimiento	Aislado	Rango de crecimiento
PVG 713	10-30°C	PVG 705	10-20°C	PVG 663	10-20°C
PVG 628	10-30°C	PVG 706	10-30°C	PVG 676	10-30°C
PVG 631	10-30°C	PVG 707	10-30°C	PVG 677	10-20°C
PVG 633	10-30°C	PVG 660	10-20°C	PVG 678	10-30°C
PVG 637	10-30°C	PVG 661	10-30°C	PVG 679	10-30°C
PVG 712	10-20°C	PVG 708	10-30°C	PVG 680	10-30°C
PVG 655	10-30°C	PVG 709	10-20°C	PVG 681	10-30°C
PVG 650	10-20°C	PVG 710	10-30°C	PVG 682	10-30°C
PVG 714	10-20°C	PVG 711	10-20°C	PVG 717	10-20°C
PVG 715	10-30°C	PVG 716	10-30°C	PVG 718	10-30°C
PVG 683	10-30°C	PVG 719	10-30°C	PVG 720	10-30°C
PVG 721	10-20°C	PVG 722	10-30°C	PVG 684	10-30°C
PVG 685	10-30°C	PVG 723	10-30°C	PVG 724	10-30°C
PVG 686	10-30°C	PVG 725	10-30°C	PVG 726	10-30°C
PVG 687	10-20°C	PVG 727	10-30°C	PVG 689	10-20°C
PVG 688	10-20°C	PVG 728	10-20°C	PVG 690	10-20°C
PVG 729	10-30°C	PVG 730	10-30°C	PVG 731	10-30°C
PVG 691	10-20°C	PVG 692	10-30°C	PVG 693	10-20°C
PVG 733	10-20°C	PVG 694	10-20°C	PVG 734	10-20°C
PVG 695	10-20°C	PVG 696	10-30°C	PVG 735	10-30°C
PVG 736	10-20°C	PVG 737	10-20°C	PVG 697	10-20°C
PVG 698	10-30°C	PVG 738	10-30°C	PVG 739	10-30°C
PVG 699	10-30°C	PVG 700	10-30°C	PVG 740	10-20°C
PVG 701	10-30°C	PVG 702	10-30°C	PVG 703	10-30°C
PVG 741	10-30°C	PVG 742	10-20°C	PVG 743	10-20°C
PVG 704	10-30°C	PVG 744	10-20°C	PVG 745	10-20°C

PVG 746	10-20°C	PVG 747	10-20°C	PVG 748	10-20°C
PVG 749	10-20°C	PVG 750	10-20°C	PVG 751	10-20°C

ANEXO 4

Cinética de crecimiento

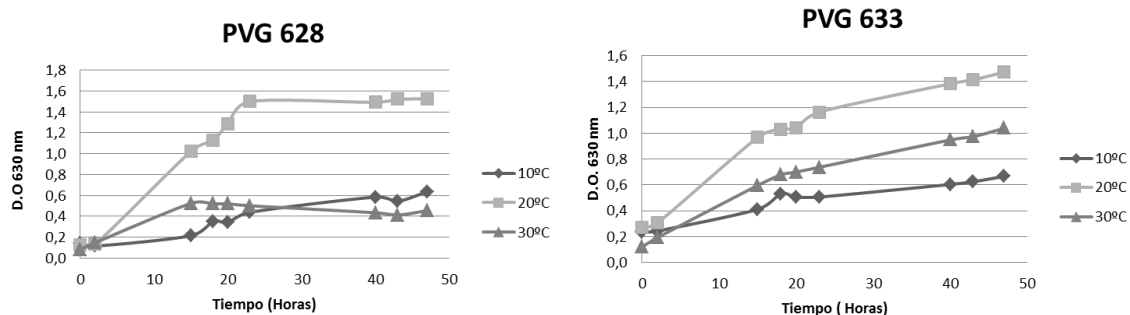


Figura 1. Curvas de crecimiento obtenidas mediante la cinética de crecimiento a 10- 20-30 °C para los aislados PVG628 y PVG633

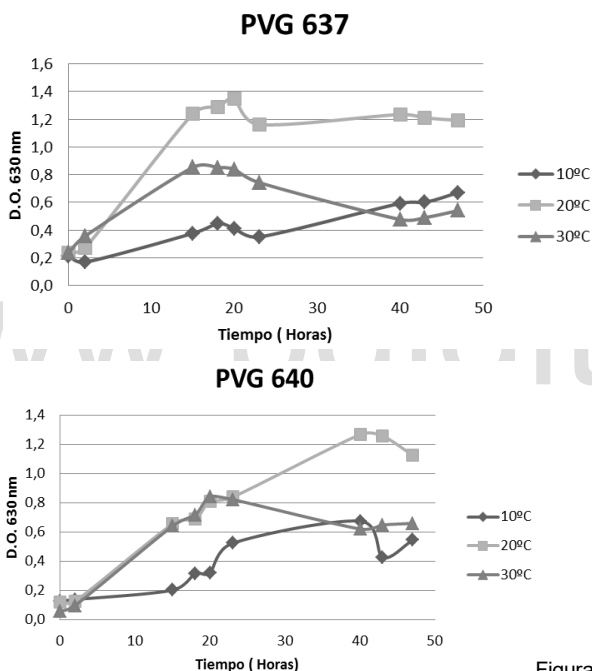


Figura 2. Curvas de crecimiento obtenidas mediante la cinética de crecimiento a 10- 20-30 °C para los aislados PVG637 y PVG640

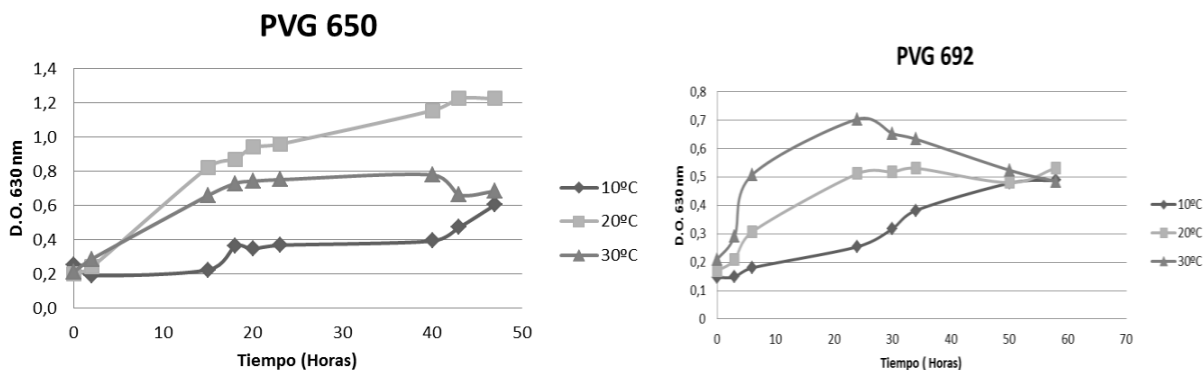


Figura 3. Curvas de crecimiento obtenidas mediante la cinética de crecimiento a 10- 20-30 °C para los aislados PVG650 y PVG692

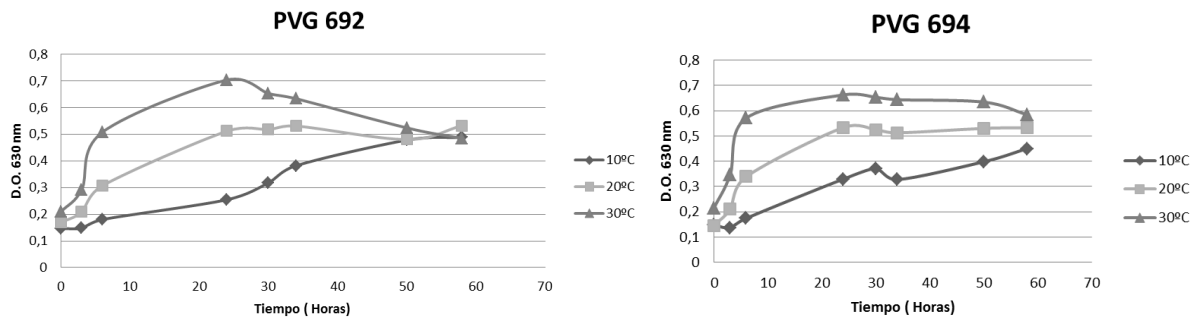


Figura 4 Curvas de crecimiento obtenidas mediante la cinética de crecimiento a 10- 20-30 °C para los aislados PVG692 y PVG694

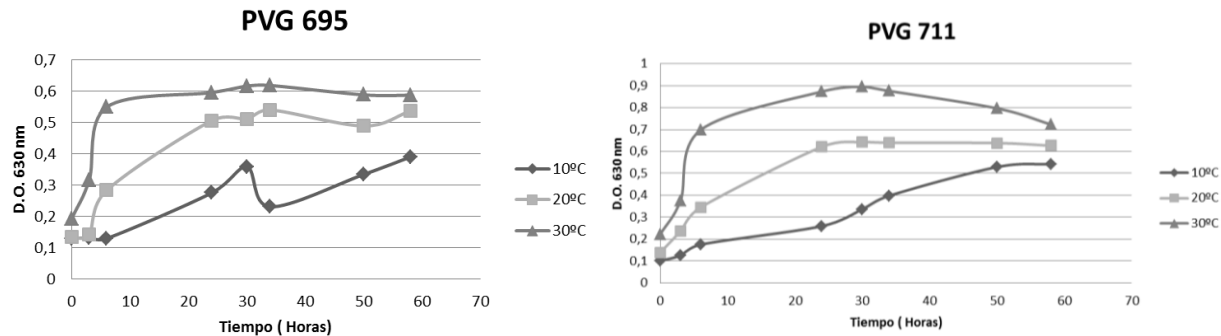
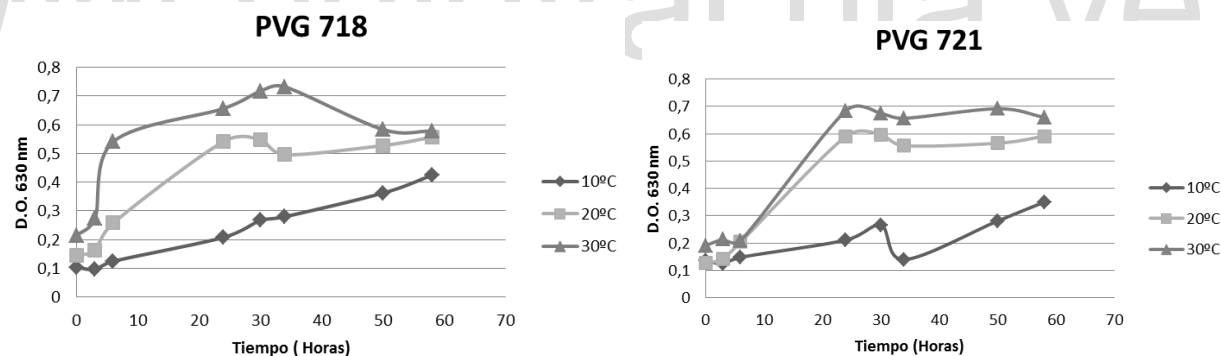


Figura 5. Curvas de crecimiento obtenidas mediante la cinética de crecimiento a 10- 20-30 °C para los aislados PVG695 y PVG711



Figra 6. Curvas de crecimiento obtenidas mediante la cinética de crecimiento a 10- 20-30 °C para los aislados PVG718 y PVG721

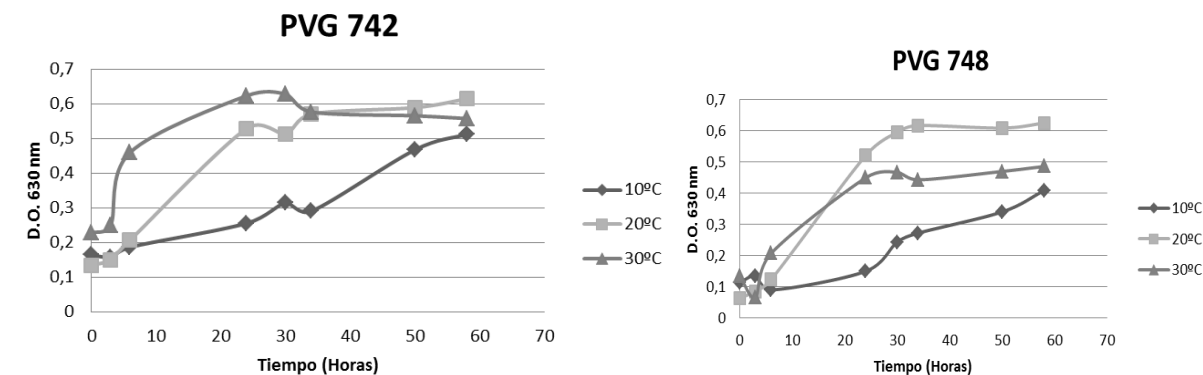


Figura 7. Curvas de crecimiento obtenidas mediante la cinética de crecimiento a 10- 20-30 °C para los aislados PVG742 y PVG748

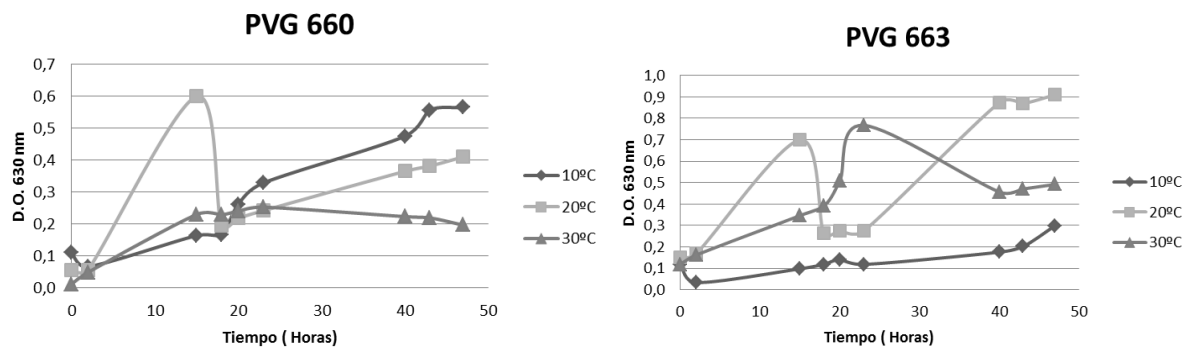


Figura 8. Curvas de crecimiento obtenidas mediante la cinética de crecimiento a 10- 20-30 °C para los aislados PVG660 y PVG663

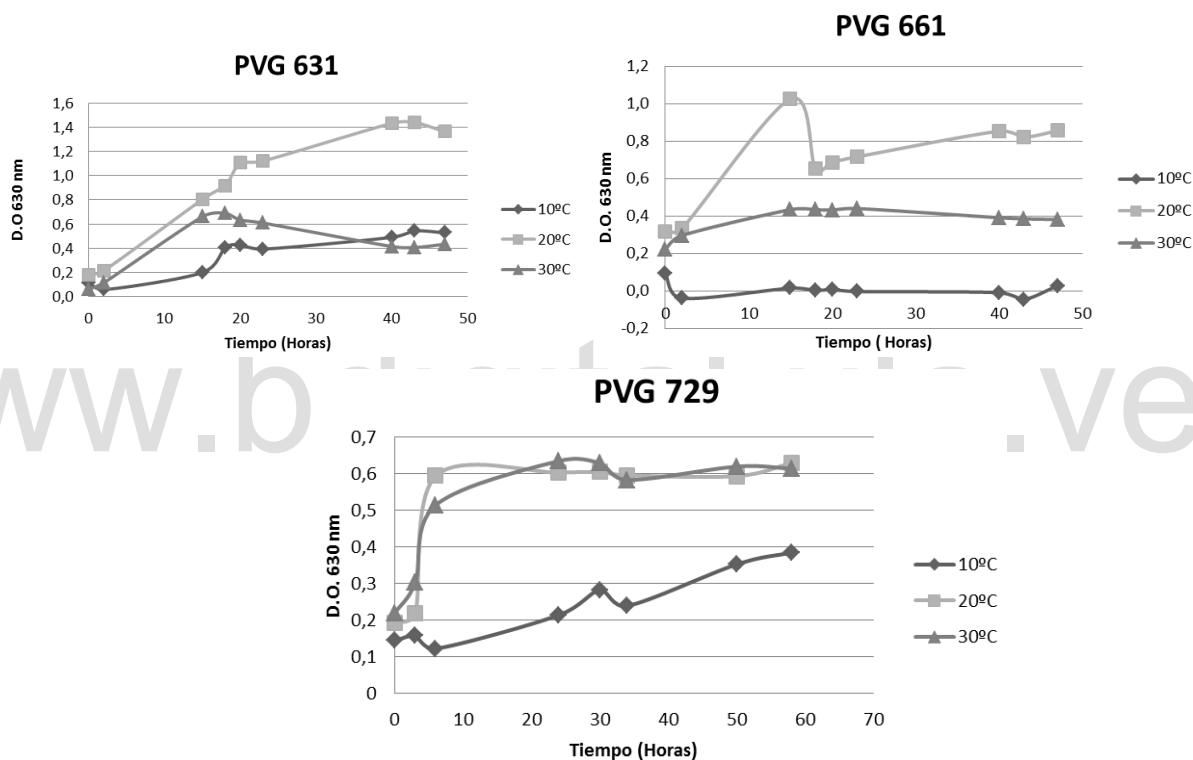


Figura 9. Curvas de crecimiento obtenidas mediante la cinética de crecimiento a 10- 20-30 °C para los aislados PVG631 , PVG661 y PVG729

ANEXO 5

Tabla 3. Producción de biomasa y tasas de crecimiento

Las tasas de crecimiento se calcularon con la siguiente ecuación (Widdel, 2007)

$$\mu = 2,303 \times \frac{(\lg D.O.2 - \lg D.O.1)}{(t2 - t1)}$$

Aislado	Biomasa 10°C	Biomasa 20°C	Biomasa 30°C	μ 10°C	μ 20°C	μ 20°C
PVG 692	0,0041	0,0113	0,0108	0,0191	0,0283	0,0181
PVG 693	0,0077	0,0100	0,0080	0,0318	0,0262	0,0140
PVG 694	0,0086	0,0108	0,0050	0,0354	0,0252	0,0083
PVG 695	0,0081	0,01237	0,0025	0,0419	0,0327	0,0045
PVG 711	0,0046	0,0097	0,0097	0,0217	0,0327	0,0124

PVG 718	0,0046	0,0157	0,0064	0,0284	0,0412	0,0107
PVG 721	0,0035	0,0214	0,0264	0,0197	0,0590	0,0659
PVG 729	0,0050	0,0005	0,0066	0,0311	0,0008	0,0117
PVG 735	0,0039	0,0178	0,0156	0,0232	0,0519	0,0332
PVG 742	0,0038	0,0178	0,0090	0,0173	0,0520	0,0169
PVG 748	0,0033	0,0220	0,0134	0,0284	0,0799	0,0429
PVG 745	0,0082	0,0225	0,0076	0,0425	0,0656	0,1256
PVG 655	0,0116	0,0211	0,0095	0,0070	0,0025	0,0016

ANEXO 6

Tabla 4. Resistencia de los aislados de los aislados bacterianos a diferentes concentraciones de antibióticos

Aislado	Amp 20mg/ml	Amp 50mg/ml	Tet 20 mg/ml	Tet 100 mg/ml	Cam 25 mg/ml	Cam 100 mg/ml	Pen 20 mg/ml	Pen 100 mg/ml
PVG 625	+	+	-	-	+	+	+	+
PVG 626	-	-	-	-	-	-	-	-
PVG 627	-	-	-	-	-	-	+	+
PVG 628	+	+	-	-	+	+	+	+
PVG 629	+	-	-	-	+	+	+	-
PVG 630	+	+	-	-	+	+	+	+
PVG 631	+	+	-	-	+	+	+	+
PVG 632	+	+	-	-	+	+	+	+
PVG 633	+	+	-	-	+	+	+	+
PVG 634	+	+	-	-	+	+	+	+
PVG 635	+	+	-	-	+	+	+	+
PVG 636	+	+	-	-	+	+	+	+
PVG 637	+	+	-	-	+	+	+	+
PVG 638	+	+	-	-	+	+	+	+
PVG 639	+	+	-	-	+	+	+	+
PVG 640	+	+	-	-	+	+	+	+
PVG 641	+	+	-	-	+	+	+	+
PVG 642	+	+	-	-	+	+	+	+
PVG 643	-	-	-	-	-	-	-	-
PVG 644	+	+	-	-	+	+	+	+
PVG 645	+	+	-	-	+	+	+	+
PVG 646	+	-	-	-	-	-	-	-
PVG 647	+	+	-	-	+	+	+	+
PVG 648	+	+	-	-	+	+	+	+
PVG 649	+	+	-	-	+	+	+	+
PVG 650	+	-	-	-	-	-	+	+
PVG 651	+	+	-	-	+	+	+	+
PVG 652	+	+	-	-	-	-	+	-
PVG 653	+	+	-	-	-	-	+	+
PVG 654	+	+	-	-	+	-	+	+
PVG 655	-	-	-	-	+	-	+	-
PVG 656	+	+	-	-	+	+	+	+
PVG 657	-	-	-	-	-	-	-	-
PVG 658	-	-	-	-	-	-	+	+
PVG 659	+	+	-	-	+	+	+	+

PVG 660	+	+	-	-	-	-	-	-
PVG 661	+	+	-	-	+	+	+	+
PVG 662	+	+	-	-	+	+	+	+
PVG 663	+	+	+	-	-	-	+	+
PVG 664	-	-	-	-	-	-	+	-
PVG 665	+	+	-	-	+	+	+	+
Aislado	Amp 20mg/ml	Amp 50mg/ml	Tet 20 mg/ml	Tet 100 mg/ml	Cam 25 mg/ml	Cam 100 mg/ml	Pen 20 mg/ml	Pen 100 mg/ml
PVG 666	+	+	-	-	-	-	+	+
PVG 667	+	+	-	-	-	-	+	+
PVG 668	+	-	-	-	-	-	+	-
PVG 669	+	+	-	-	-	-	+	+
PVG 670	+	-	-	-	-	-	+	-
PVG 671	-	-	-	-	-	-	+	-
PVG 672	+	+	-	-	-	-	+	+
PVG 673	-	-	-	-	-	-	-	-
Resist/total	40/49	36/49	02/49	0/49	28/49	27/49	42/49	36/49
PVG246	+	+	-	-	+	-	+	+

Continuación tabla 6 Resistencia de los aislados bacterianos a diferentes concentraciones de antibióticos

Aislado	Str 25 mg/ml	Str 100 µg/ml	Ácido Nal 25 µg/ml	Ácido Nal 100 µg/ml	Kan 25 µg/ml	Kan 150 µg/ml	Resist/Antib Probados
PVG 625	+	+	-	-	+	+	5/7
PVG 626	-	-	-	-	-	-	0/7
PVG 627	+	+	-	-	-	-	2/7
PVG 628	+	+	+	-	+	+	6/7
PVG 629	-	-	+	-	+	-	5/7
PVG 630	+	-	-	-	+	+	5/7
PVG 631	+	-	-	-	+	+	5/7
PVG 632	+	+	+	+	+	+	6/7
PVG 633	+	+	+	+	+	+	6/7
PVG 634	+	+	+	+	+	+	6/7
PVG 635	+	+	+	+	+	+	6/7
PVG 636	+	+	+	-	+	+	6/7
PVG 637	+	+	-	-	+	+	5/7
PVG 638	+	+	-	-	+	+	5/7
PVG 639	+	+	+	-	+	+	6/7
PVG 640	-	-	-	-	+	+	4/7
PVG 641	+	+	-	-	+	+	5/7
PVG 642	+	+	-	-	+	+	5/7
PVG 643	-	-	-	-	-	-	0/7

PVG 644	+	-	+	-	+	+	6/7
PVG 645	+	+	-	-	+	+	5/7
PVG 646	-	-	-	-	-	-	1/7
PVG 647	+	+	+	+	+	+	6/7
PVG 648	+	-	-	-	+	+	5/7
PVG 649	+	-	+	+	+	+	6/7
PVG 650	+	+	-	-	+	+	4/7
PVG 651	+	-	+	+	+	+	6/7
PVG 652	+	-	-	-	-	-	3/7
PVG 653	+	-	-	-	+	-	4/7
PVG 654	+	-	-	-	-	-	4/7
PVG 655	+	+	+	+	-	-	4/7
PVG 656	+	+	+	+	+	+	6/7
PVG 657	+	+	+	+	+	-	3/7
PVG 658	+	+	+	+	+	+	4/7
PVG 659	+	+	+	+	+	+	6/7
PVG 660	-	-	-	-	-	-	1/7
PVG 661	-	-	-	-	+	-	4/7
PVG 662	+	-	-	-	+	+	5/7
PVG 663	-	-	-	-	+	+	4/7
PVG 664	-	-	-	-	+	-	2/7
PVG 665	+	+	+	+	+	+	6/7
PVG 666	+	-	-	-	+	+	4/7
PVG 667	+	-	-	-	-	-	3/7
PVG 668	+	+	-	-	+	+	4/7
PVG 669	+	-	-	-	-	-	3/7
PVG 670	+	+	-	-	+	+	4/7
PVG 671	-	-	-	-	+	+	2/7
PVG 672	-	-	-	-	-	-	2/7
PVG 673	-	-	+	+	-	-	1/7
Resist/total	36/53	24/53	19/53	14/53	37/53	33/53	
PVG246	-	+	+	+	+	+	6/7

ANEXO 7

Tabla 7. Tolerancia de los aislados a crecer en diferentes concentraciones de metales pesados

Aislado	Zn 50 ppm	Zn 100 ppm	Zn 200 ppm	Cu 50 ppm	Cu 100 ppm	Cu 200 ppm	Ni 50 ppm	Ni 100 ppm	Ni 200 ppm
PVG 628	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PVG 631	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PVG 633	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PVG 637	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PVG 640	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PVG 650	-	-	-	+	-	-	+	-	-
PVG 655	+	+	+	+	-	-	+	-	-
PVG 660	+	+	+	-	-	-	+	+	+
PVG 661	+	-	-	+	+	-	+	-	-
PVG 663	-	-	-	+	+	-	+	+	+
PVG692	+	+	+	+	+	-	+	-	-
PVG693	+	+	+	+	+	+	+	-	-
PVG694	+	+	+	+	+	-	+	+	-
PVG695	+	+	+	+	+	-	+	+	-
PVG711	+	+	+	+	+	-	+	+	-
PVG718	+	+	+	-	-	-	+	+	+
PVG721	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PVG729	-	-	-	+	+	-	-	-	-
PVG735	+	+	+	+	+	-	+	+	+
PVG742	+	+	+	-	-	-	-	-	-
PVG745	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PVG748	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Continuación tabla 7. Tolerancia de los aislados a crecer en diferentes concentraciones de metales pesados

Aislado	Cr 50 ppm	Cr 100 ppm	Cr 200 ppm	Co 50 ppm	Co 100 ppm	Co 200 ppm	Resist/Metales Probados
PVG 628	+	+	+	+	+	+	5/5
PVG 631	+	+	+	+	+	+	5/5
PVG 633	+	+	+	+	+	+	5/5
PVG 637	+	+	+	+	+	+	5/5
PVG 640	+	+	+	+	+	+	5/5
PVG 650	-	-	-	+	+	+	3/5
PVG 655	+	-	-	+	+	+	5/5
PVG 660	+	+	-	+	+	-	4/5
PVG 661	+	-	-	+	+	+	5/5
PVG 663	-	-	-	+	+	+	3/5
PVG692	+	+	+	-	-	-	4/5
PVG693	+	+	+	-	-	-	4/5
PVG694	+	+	+	+	-	-	5/5
PVG695	+	+	+	+	-	-	5/5
PVG711	+	+	+	-	-	-	4/5
PVG718	+	+	+	+	+	+	4/5
PVG721	+	+	+	+	+	+	4/5
PVG729	-	-	-	+	+	-	2/5

PVG735	+	+	+	-	-	-	4/5
PVG742	+	+	+	+	+	-	3/5
PVG745	+	+	+	-	-	-	4/5
PVG748	+	+	+	+	+	-	4/5

ANEXO 8

Tabla 8. Producción de enzimas activas a bajas temperaturas evaluadas en 22 aislados

Aislado	Proteasas	Amilasas	Catalasas	β -Gal	Oxidasa
PVG628	-	-	+	-	+
PVG631	+	-	+	-	+
PVG633	-	-	+	-	+
PVG637	+	-	+	-	+
PVG640	-	-	+	-	+
PVG650	-	-	+	-	+
PVG655	+	-	+	-	+
PVG660	-	-	+	-	+
PVG661	-	-	+	-	+
PVG663	-	-	+	+	+
PVG692	+	-	+	-	+
PVG693	+	-	+	-	+
PVG694	+	-	+	-	+
PVG695	+	-	+	-	+
PVG711	+	-	+	-	+
PVG718	-	-	+	-	+
PVG721	-	-	+	-	+
PVG729	-	-	+	-	+
PVG735	-	-	+	-	+
PVG742	-	-	+	-	+
PVG745	-	-	+	-	+
PVG748	-	-	+	-	+
total	8/22	0/22	22/22	1/22	22/22

ANEXO 9

Tabla 9. Porcentaje de MOS y desviación estándar

Orientación	%MOS	s
PI2 Norte	14,0672349	0,45407537
PI2 Sur	14,8177132	1,32807972
PI2 Este	19,2277223	1,60542734
PI2 Oeste	13,4595035	0,41018748
MO Norte	3,26883333	1,1771375
MO Sur	2,4079375	0,6046482
MO Este	3,4372125	0,42670096
MO Oeste	6,31865	1,68337669

www.bdigital.ula.ve