

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS CULTIVABLES DE
AMBIENTES EXTREMOS (BOSQUE ALTO ANDINO)**



BETTY ARIANE CORAL CAÑÓN

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2018**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS CULTIVABLES DE
AMBIENTES EXTREMOS (BOSQUE ALTO ANDINO)**

BETTY ARIANE CORAL CAÑÓN

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
BIOLOGO**

**Directora:
M. Sc NILZA VELASCO PALOMINO**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2018**

Nota de Aceptación

Director _____

M. Sc. Nilza Velasco Palomino

Jurado _____

Microbióloga Bibiana Stella Duarte Restrepo

Jurado _____

Dr. Willian Orlando Castillo

Fecha de sustentación: Popayán, 13 de Febrero de 2018

DEDICATORIA

A la memoria de mi padre Peregrino Coral, por su amor y enseñanzas, a mi madre Carmenza Cañón y a mis hermanos, por su confianza y por darme la fuerza e inspiración para ser mejor cada día.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Cauca por contribuir en mi formación académica, por ofrecerme los espacios, equipos, recursos humanos y educación de excelente calidad para mi formación profesional.

Al programa de Biología y sus profesores, por darme excelentes bases en mi formación académica.

Al laboratorio de Biología de la Universidad del Cauca y a sus laboratoristas por su disposición y colaboración durante el desarrollo del trabajo.

A la doctora Patricia Eugenia Vélez Varela y a la M. Sc Ivon Andrea Bolaños por brindarme un espacio en el laboratorio de Genómica y Bioinformática BIMAC, donde se desarrolló toda la investigación.

A la M Sc. Liliana Caldas Arias de la facultad de ciencias de salud, por su colaboración y aportes en el desarrollo de esta investigación.

Al doctor Nelson Rojas, por brindarme un espacio en el laboratorio de Biología Molecular y Celular, para realizar algunos ensayos.

A mi directora M.Sc. Nilza Velasco Palomino, por creer en mí, por su apoyo incondicional en todo momento, por sus enseñanzas, paciencia, confianza, entusiasmo y buenas ideas.

A la M Sc. Yennifer Yadira tovar por sus aportes metodológicos durante esta investigación.

Al M Sc. Camilo Ernesto Andrade, por su aporte en el desarrollo estadístico en la investigación.

A mis evaluadores la microbióloga Bibiana Stella Duarte y al Dr. Willian Orlando Castillo por sus valiosos aportes para el desarrollo del presente trabajo.

A Laura Amaya Hernández, por su amistad, por hacerme reír con sus locuras y por compartir con migo buenos momentos.

A Martha Valdés, por brindarme su amistad y por prestarme una infinidad de veces su computador, el cual fue de gran ayuda durante mi carrera.

A Katheryn Bambague, por ser mi compañera de laboratorio y haber hecho de este un espacio más llevadero.

A todas las personas, compañeros y profesores, que fueron parte de mi formación académica, por darme enseñanzas de vida y apoyo en cada una de las etapas vividas.

TABLA DE CONTENIDO

Pág.

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	13
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. MARCO TEORICO.....	18
4.1 ECOSISTEMAS DE ALTA MONTAÑA	22
4.2 EL SUELO COMO AMBIENTE EXTREMO	21
4.3 MICROORGANISMOS DE AMBIENTES EXTREMOS.....	22
5. ANTECEDENTES	25
6. OBJETIVOS	29
6.1 Objetivo general.....	29
6.2 Objetivos específicos	29
7. MATERIALES Y METODOS	30
7.1 TIPO DE ESTUDIO.....	30
7.2 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	30
7.3 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	31
7.3.1 Mantenimiento de las muestras.....	31
7.3.2 Determinación del pH de las muestras.....	32
7.3.3 Cultivo primario.	32
7.3.4 Siembra en placa.	32
7.3.5 Determinación de la población y diversidad bacteriana	32
7.3.6 Aislamiento y purificación bacteriana.	33
7.4 CARACTERIZACIÓN BACTERIANA.....	34
7.4.1 Caracterización macroscópica..	34
7.4.2 Caracterización microscópica.....	34
7.4.3 Caracterización Bioquímica.....	35
7.5 CONSERVACIÓN DE CEPAS.....	38
7.6 ANÁLISIS DE DATOS	38
8. RESULTADOS.....	40
8.1 DETERMINACIÓN DE PH.....	40

8.2	DETERMINACIÓN DE LA POBLACIÓN Y DIVERSIDAD BACTERIANA	40
8.2.1	Época de lluvia	40
8.2.2	Época seca	44
8.3	AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN BACTERIANA	49
8.4	CARACTERIZACIÓN BACTERIANA	50
8.4.1	Caracterización macroscópica	49
8.4.2	Caracterización microscópica	55
8.5	IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA	58
9.	DISCUSIÓN	66
10.	CONCLUSIONES	71
11.	RECOMENDACIONES	72
12.	BIBLIOGRAFÍA	73

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación de los microorganismos en función de su temperatura óptima de crecimiento.....	24
Tabla 2. Tratamientos correspondientes a la combinación entre las variables A y B en estudio para las muestras de suelo de ZTBP.	30
Tabla 3. Control positivo y negativo para cada prueba bioquímica.....	36
Tabla 4. Resultado del pH determinado para las dos muestras que fueron utilizadas en este estudio.	40
Tabla 5. Resultados del número de UFC/g obtenidos a diferentes temperaturas (20, 27, 32 y 37°C). Época de lluvia.....	41
Tabla 6. Número de UFC x 10 ³ obtenidas en dos condiciones de pH (2.6 y 6)	42
Tabla 7. Resultados de la abundancia de UFC para cada combinación entre temperatura y pH. Época de lluvia.	43
Tabla 8. Resultados del número de UFC/g obtenidos a diferentes temperaturas (20, 27, 32 y 37°C) sin distinguir el pH. Época seca.	44
Tabla 9. Número de UFCx10 ³ obtenidas en dos condiciones de pH (2.6 y 6)	45
Tabla 10. Resultados de la abundancia de UFC para cada combinación entre temperatura y pH en época seca	47
Tabla 11. Densidad bacteriana en la dos épocas de muestreo.....	48
Tabla 12. Características morfológicas macro y microscópicas	51
Tabla 13. Morfotipos identificados en las diferentes épocas de muestreo.....	64

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representación esquemática de los diferentes ecosistemas y tipos fisionómicos de vegetación que conforman el mosaico de la zona de transición bosque-páramo.	21
Figura 2. Imágenes de los sitio muestreados..	31
Figura 3. Esquema de cultivo de bacterias a partir de muestra de suelo.....	33
Figura 4. Diagrama de endosporas no deformantes y deformantes de la célula.	35
Figura 5. Abundancia de UFC/g obtenidas en cuatro temperaturas (20, 27, 32 y 37°C)Época de lluvia	41
Figura 6. Abundancia de UFC obtenidas en dos condiciones de pH (2.6 y 6)	42
Figura 7. Número de UFC/g obtenidas en las diferentes condiciones de temperatura a pH 6. Época de lluvia.....	43
Figura 8. Número de UFC/g obtenidas en las diferentes condiciones de temperatura a pH 2.6. Época de lluvia.....	44
Figura 9. Abundancia de UFC/g obtenidas en cuatro temperaturas (20, 27, 32, y 37°C) para la muestra de suelo en época seca.....	45
Figura 10. Abundancia de UFC obtenidas en dos condiciones de pH (2.6, 6) en época seca.	46
Figura 11. Número de UFC/g obtenidas en las diferentes condiciones de temperatura a pH 6. Época seca.....	47
Figura 12. Númeo de UFC/g obtenidas en las diferentes condiciones de temperatura a pH 2.6. Época seca.....	48
Figura 13. Promedio de la densidad de UFC en suelos de ZTBP.....	49
Figura 14. Aislamientos de cepas bacterianas axénicas.....	50
Figura 15. Morfología de diferentes colonias bacterianas de suelo de ZTBP.	54
Figura 16. Análisis de cluster. Relación entre las características fenotípicas.....	54

Figura 17. Análisis de cluster. Relación entre las características fenotípicas de 18 cepas bacterianas aisladas de suelo de ZTBP en época seca	54
Figura 18. Porcentaje de bacilos y cocos aislados en cada época de muestreo. 55	
Figura 19. Tinción de Gram de cultivos puros luego de 24h de crecimiento en medio sólido Agar Nutritivo.	56
Figura 20. Abundancia porcentual de los grupos Gram + y Gram - en época de lluvia para la muestra de suelo de ZTBP.....	57
Figura 21. Abundancia porcentual de los grupos Gram + y Gram negativos en época seca para la muestra de suelo de ZTBP.....	57
Figura 22. Tinción con verde de malaquita de aislados bacterianos axénicos de muestra de suelo de ZTBP.....	58
Figura 23. Nivel taxonómico clase. Época de lluvia y seca.....	60
Figura 24. Nivel taxonómico orden. Época de lluvia y seca.....	60
Figura 25. Distribución porcentual de las diferentes familias identificadas. Época lluvia.....	61
Figura 26. Distribución porcentual de las diferentes familias identificadas en la muestra de suelo de ZTBP en época seca.....	61
Figura 27. Distribución porcentual de los diferentes géneros identificados en la muestra de suelo de ZTBP en época de lluvia.....	62
Figura 28. Distribución porcentual de los diferentes géneros identificados en la muestra de suelo de ZTBP en época seca.....	62
Figura 29. Análisis de clúster de 23 cepas bacterianas aisladas a partir de muestra de suelo de ZTBP en dos épocas.....	63

RESUMEN

Colombia es considerada uno de los 17 países más biodiverso, por su amplia variedad de especies de fauna y flora, situación que permite intuir un perfil megadiverso en las poblaciones de microorganismos, el cual se ha evidenciado en diferentes investigaciones dirigidas al aislamiento e identificación de nuevas especies bacterianas, en diferentes ecosistemas. Entre los ecosistemas que actualmente han tomado mayor interés están los ambientes extremos; los microorganismos de estos ambientes, se destacan por vivir y ser capaces de llevar acabo procesos metabólicos bajo extremas condiciones; a su vez, los microorganismos extremófilos, han demostrado poseer un gran potencial biotecnológico, constituyéndose de gran importancia a nivel industrial, farmacéutico y ecológico. Por lo anterior, el objetivo de este estudio busca contribuir a los estudios de biodiversidad bacteriana en ambientes extremos, mediante el aislamiento e identificación de bacterias provenientes de una zona de transición bosque alto andino-páramo en el Parque Natural Nacional Los Nevados, Caldas-Colombia. Las muestras fueron inoculadas en medio Caldo nutritivo y agar nutritivo a diferentes temperaturas entre un rango de 20-37°C, con diferentes pH (2.6 y 6) y bajo condiciones aerobias. A continuación se realizó caracterización macroscópica y microscópica, mediante descripción de morfología, tinción diferencial y selectiva (Gram y endosporas respectivamente). Así mismo, se realizaron estudios bioquímicos. De los estudios anteriores se aislaron 36 cepas, dentro de las cuales se encuentran, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Virgibacillus*, *Solibacillus*, *Micrococcus*, *Kocuria*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia Pantoea* y *Escherichia*; con un amplio perfil bioquímico. Lo anterior permite concluir que las zonas de transición bosque alto andino-páramo en el PNNN, presentan una gran diversidad bacteriana cultivable con posible potencial biotecnológico.

Palabras clave: Microorganismo, bosque-páramo, suelo, vulnerabilidad.

1. INTRODUCCIÓN

Colombia es uno de los países con mayor biodiversidad, reconocido por su amplia variedad biótica, distribuida en diferentes ambientes (Andrade, 2011). Dentro de estos ambientes se encuentran los ecosistemas extremos, los cuales han recibido atención por parte de investigadores, debido a sus condiciones físico-químicas extremas, que suponen la presencia de especies con características únicas, adaptadas a estos ambientes (Rubiano, 2006; Casablanca *et al.*, 2011). Los ecosistemas de alta montaña, cuentan con ambientes con características únicas y extremas, como las zonas de transición bosque-páramo (Sarmiento y León, 2015); estas zonas presentan condiciones microambientales fluctuantes (Montenegro y Ríos, 2008), debido a que los elementos de páramo se entremezclan con el bosque alto andino, obedeciendo a una estrecha relación ecológica entre estos dos ecosistemas (Llambí, 2015). Estos ecosistemas admiten la colonización de organismos que presentan una adaptación específica y común (Dion y Nautiyal, 2008); tal es el caso de microorganismos, como las bacterias, capaces de sobrevivir y llevar a cabo procesos metabólicos bajo extremas condiciones (Calvo, 2010), por lo cual los suelos de ambientes extremos han sido el tema de varios estudios, sobre la caracterización de comunidades y procesos microbianos, que han permitido estudiar la amplia adaptabilidad microbiana y visualizar aplicaciones prácticas (Dion y Nautiyal, 2008).

Las técnicas de estudios de los microorganismos dependientes de cultivos en el laboratorio, permiten tener un conocimiento sobre sus características morfológicas, fisiológicas, y metabólicas, que pueden revelar aspectos aun inadvertidos, lo que conduce a un mejor conocimiento sobre la función de los microorganismos en estos ecosistemas.

En el presente trabajo se escogieron suelos del "Ecosistema bosque alto andino-páramo", en la zona de amortiguación Villa María en el Parque Natural Nacional

Los Nevados (PNNN), dada la especificidad de su conformación biótica, su rol ecosistémico, alta diversidad y vulnerabilidad; se caracterizó la morfología y fisiología de comunidades bacterianas cultivables en estos suelos, mediante su aislamiento e identificación, utilizando la técnica de dilución en tubo y dispersión directa en medio agar nutritivo. Se hizo análisis comparativo con base en aspectos cualitativos y cuantitativos de las bacterias aisladas a partir de las muestras de suelo en dos épocas de muestreo.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las condiciones bióticas y abióticas de alta montaña hacen del encuentro entre el Bosque Alto Andino y el Páramo una zona heterogénea y diversa. Sin embargo, la intensificación en el uso del suelo de alta montaña y el cambio climático, genera cambios importantes en la cobertura vegetal, procesos ecológicos y la prestación de servicios ecosistémicos, siendo las Zonas de Transición Bosque-Páramo (ZTBP) particularmente sensibles a ser afectadas por estos fenómenos, ya que es la zona potencial de colonización o avance del bosque sobre el páramo (Sarmiento y León, 2015). Los organismos del suelo que habitan los ecosistemas de alta montaña pueden verse afectados en su comportamiento, distribución horizontal y vertical, crecimiento y reproducción, consecuentemente afectando las relaciones intra e interespecíficas, que contribuyen a las características propias del suelo (Parmesan y Yohe, 2003) tomado de Tovar, (2011).

La fauna edáfica del suelo, como las bacterias, participan en los procesos de descomposición de la materia orgánica, mineralización y ciclaje de nutrientes y por ello se consideran importantes para la mineralización o liberación de nutrientes en formas asimilables para las plantas (Lenz y Eisenbeis, 2000) tomado de Suárez, (2010). Sin embargo, existe una pobre estimación de biodiversidad de microorganismos esenciales en los ciclos naturales, puesto que los estudios ecológicos sobre el impacto de los cambios ambientales se han centrado principalmente en la vegetación (Llambí, 2015). Por lo cual con este tipo de estudios se busca ampliar el conocimiento sobre las comunidades bacterianas, sus características morfológicas y fisiológicas; a fin de contribuir al conocimiento de la biodiversidad en este tipo de ecosistemas. Por tanto en este estudio se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Existe relación entre la abundancia de bacterias cultivables, con los parámetros fisicoquímicos (T y pH), que determinan mayor densidad de bacterias en las épocas de lluvia y época seca?

3. JUSTIFICACIÓN

Existe un claro interés por la conservación y el reconocimiento estratégico de los ecosistemas de Alta montaña; especialmente de los páramos, los cuales han sido reconocidos como ecosistemas complejos, biodiversos, de alto endemismo, que prestan valiosos servicios ambientales. No obstante, las montañas y sus ecosistemas son muy vulnerables al desequilibrio ecológico ocasionado por factores naturales como los cambios climáticos y por factores humanos provocando erosión acelerada de los suelos, desprendimiento de tierras, pérdida de diversidad biológica, degradación de cuencas hidrográficas y fragmentación (Ministerio del Medio Ambiente, 2002).

Los estudios en estos ecosistemas tienen gran variedad de enfoques entre los que se destacan: el uso y conservación del suelo (Avellaneda *et al.*, 2014; Flórez *et al.*, 2014), sostenibilidad ambiental del ecosistema (De Los Ríos y Almeida, 2010), caracterización de fauna especialmente avifauna (Meneses y Herrera, 2013). Sin embargo, estudios sobre microbiota en estos ecosistemas es un aspecto poco estudiado, se han reportado estudios relacionados con los efectos del uso del suelo sobre la microbiota (Moratto *et al.*, 2005), la flora cultivable en páramo (Bernal *et al.*, 2006), y más recientemente se han realizado aproximaciones metagenómicas sobre la composición y funcionalidad de microorganismos (Montaña *et al.*, 2011); e igualmente, la caracterización de grupos funcionales (Avellaneda y Torres, 2013). No obstante, todas estas investigaciones se han centrado en el ecosistema de páramo y hasta el momento no hay reportes sobre caracterización microbiológica en zonas de transición bosque-páramo.

Estos ecosistemas de transición, también son considerados como zonas de gran diversidad y altos niveles de endemismo. Sin embargo, son altamente vulnerables frente a los disturbios, lo que altera su estructura, composición florística, dinámica de regeneración y condiciones microambientales; aun así han recibido menos

atención en la literatura que las selvas nubladas y los páramos (Llambí, 2015). Por tanto, esta investigación se plantea como una primera aproximación al estudio de la microflora bacteriana en un ecosistema de transición Bosque-Páramo, con la finalidad de hacer un aporte hacia el conocimiento de la biodiversidad bacteriana, paralelo a la preservación y protección de estos ecosistemas.

4. MARCO TEORICO

4.1 ECOSISTEMAS DE ALTA MONTAÑA

4.1.1 Bosque Alto Andino. Los bosques andinos que están comprendidos en una franja entre los 2.900 y los 3.800 msnm, se denominan Altoandinos. Son representativos de estos bosques, los robledales y los bosques de niebla. Estos últimos están ubicados en zonas donde el aire ascendente y saturado de vapor de agua que proviene de regiones bajas, húmedas y cálidas, se condensa para producir regularmente nubosidad o niebla envolvente convirtiendo estos ecosistemas en ambientes con alta humedad atmosférica (FAO, 2002). El ecosistema de Bosque Alto Andino presenta una alta diversidad biológica y cumple funciones como la regulación del flujo hídrico, la acumulación y distribución de nutrientes provenientes de los páramos (Van Wyngaarden y Fandiño, 2002; Parques Nacionales Naturales de Colombia, 2012). EL Bosque Altoandino, es el último refugio de muchas plantas y animales que en las tierras bajas han desaparecido o que tienen tal grado de adaptabilidad a la franja altitudinal de cumbre, que guardan un nivel muy alto de especificidad (endemismo), y cuya variabilidad biológica es claramente más alta a medida que se localiza sobre el eje ecuatorial (Castaño, 2002).

4.1.2. Páramos. En las partes más altas de las montañas Andinas, entre el límite superior de los bosques y el límite inferior de las zonas nivales, se encuentran los Páramos, ecosistemas complejos y variados, endémicos de los Andes tropicales venezolanos, colombianos, ecuatorianos y peruanos. En Colombia se localizan en las cordilleras Occidental, Central y Oriental, así como en la Sierra Nevada de Santa Marta, abarcando aproximadamente el 1.3% de la extensión continental del país, alcanzando su máxima representatividad en el departamento de Boyacá (Ministerio del Medio Ambiente, 2002). Están definidos como región natural por la relación entre el suelo, el clima, la biota y la influencia humana; presentan

condiciones físico-químicas y climáticas específicas, como baja presión atmosférica, frecuente cobertura de nubes y niebla, vientos fuertes, temperaturas promedio inferiores a 10°C y precipitación en forma de llovizna (Castaño, 2002; Gutiérrez *et al.*, 2006; Ruiz *et al.*, 2008 Buytaert *et al.*, 2005). Es el ecosistema con mayor irradiación solar del mundo, lo que genera la flora de montaña más rica del planeta. Presenta un alto nivel de endemismo con aproximadamente 3.379 especies de plantas; 70 especies de mamíferos, 154 especies de aves y 90 especies de anfibios (Greenpeace, 2013).

En su situación de islas continentales, los páramos poseen una reducida área con relación a otros biomas Neotropicales, lo que los hace especialmente vulnerables a la intervención humana, produciendo una transformación significativa de gran parte de su extensión (Herzog *et al.*, 2012), comprometiendo su sostenibilidad y capacidad de albergar una gran biodiversidad que no ha sido aun completamente estudiada (Congreso mundial de páramos, 2002).

4.1.3 Zona de transición Bosque-páramo. En el límite inferior (subpáramo o franja Alto andina) se presenta una zona de transición entre el bosque y la región paramuna, considerada como la zona con la mayor diversidad y los más altos niveles de endemismo vegetal, con una riqueza específica superior a la del páramo propiamente dicho por poseer vegetación proveniente de ambos ecosistemas así como vegetación restringida a esta franja de ecotonía (Morales-Betancour y Estévez-Varón, 2006).

Los resultados de investigaciones revisadas por Llambí (2015), documentan la alta riqueza de especies y formas de vida que caracterizan la vegetación de estos ecotonos, así como una alta tasa de recambio de especies a lo largo del gradiente de elevación. Así mismo, reporta que los estudios sobre la dinámica sucesional de la vegetación en áreas intervenidas por la agricultura en diferentes posiciones a lo largo de la transición indican que las especies vegetales leñosas del bosque

muestran una capacidad mucho menor de colonización de las áreas perturbadas que las especies dominantes del páramo. Enfatiza en la importancia de la conservación de los bosques parameros o subpáramos como ecosistemas de transición; pues estos bosques han recibido menos atención en la literatura que las selvas nubladas y los páramos, los cuales han sido particularmente afectados por los procesos de transformación antrópica, mostrando además una baja capacidad de regeneración frente a los disturbios; por su parte Rangel (2000) tomado de Ministerio del Medio Ambiente (2002), registra en esta zona de la alta montaña colombiana el mayor número de especies (2384 pertenecientes a 486 géneros y 115 familias), al igual que el mayor número de especies de distribución restringida (984), con respecto al páramo bajo, que tiene 1958 especies, de 415 géneros y 102 familias, y el páramo medio, con 1575 especies de 361 géneros y 90 familias. Además, presenta una alta heterogeneidad que permite la existencia de gran cantidad de nichos y hábitats para las especies de fauna. Elementos de páramo que se entremezclan con el bosque Altoandino, obedeciendo a una estrecha relación ecológica entre estos dos ecosistemas.

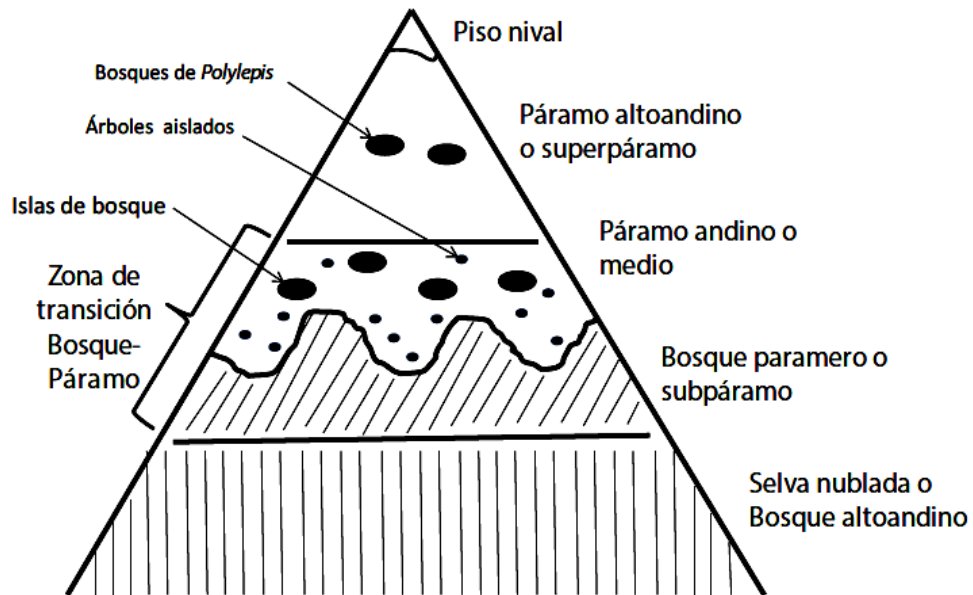


Figura 1. Representación esquemática de los diferentes ecosistemas y tipos fisionómicos de vegetación que conforman el mosaico de la zona de transición bosque-páramo, así como los ecosistemas ubicados por encima y por debajo de la transición en la alta montaña tropical. Fuente: Llambí, 2014.

4.2 EL SUELO COMO AMBIENTE EXTREMO

Según Ramírez *et al.*, 2006, el término extremófilo fue usado por primera vez por Macelroy en 1974. “Ambiente extremo”, es un término relativo, ya que los ambientes que pueden ser extremos para un organismo, pueden ser esenciales para la supervivencia de otro organismo. Los extremófilos se desarrollan bajo condiciones que podría matar a la mayoría de otras criaturas y muchos no pueden sobrevivir en los ambientes considerados globalmente normales.

Entonces un entorno extremo presenta condiciones altamente fluctuantes donde los organismos experimentan cambios ambientales periódicos o episódicos. En entornos inestables y extremos, los costos metabólicos para sobrevivir al estrés

pueden ser altos, y la mayoría de los organismos probablemente morirían (Dion y Nautiyal, 2008), pues están expuestos a una amplia variedad de condiciones, a las cuales los microorganismos se han adaptado (Van den Burg., 2003).

El carácter específico de un suelo extremo puede ser de naturaleza física y corresponder a valores extremos de temperatura o a la exposición a radiación o calor intenso. Alternativamente, también se puede definir en términos químicos, con el contenido de sal o la presencia de contaminantes tóxicos que ejercen una influencia preponderante en los procesos microbianos, el carácter extremo puede conferirse a los suelos por factores climáticos, geológicos u otros factores ambientales, o bien por actividades humana (Dion y Nautiyal, 2008; Van den Burg., 2003; Rothschild y Mancinelli., 2001),

La biodiversidad encontrada en suelos de ambientes extremos es una parte integral de la diversidad de la superficie terrestre. Son ecosistemas terrestres relativamente grandes con una variedad de formas de vida, aunque pertenecen a relativamente pocas especies. Sin embargo, los suelos extremos son valiosos como indicadores de los cambios globales que puedan afectar otros ecosistemas (Dion y Nautiyal, 2008). Esta diversidad de ambientes a los cuales diferentes extremófilos se han adaptado ofrece muchas oportunidades para una variedad de aplicaciones biotecnológicas, ecológicas y de biorremediación.

4.3 MICROORGANISMOS DE AMBIENTES EXTREMOS

La vida de los microorganismos no es limitada para ambientes específicos, las comunidades microbianas pueden ser encontradas habitando un gran variedad de ambientes (terrestres, acuáticos, regiones polares, alpinas, océanos, regiones subterráneas poco profundas, en la atmosfera, en plantas y animales; en las más diversas condiciones, que pueden incluir condiciones extremas de temperaturas, presión, salinidad y pH) (Cavicchiolo *et al.*, 2002; Van den Burg, 2003, Constantinos y Antranikian, 2004); esto también incluye nuevos tipos de hábitats

creados por actividades antropogénicas, como las contaminadas con metales pesados y altas concentraciones de compuestos xenobióticos tóxicos (Torsvik y Øvreås, 2008).

Esta capacidad de adaptación de los microorganismos se debe a que tienen alta plasticidad fisiológica y ecológica, lo que les permite estar bien adaptados para sobrevivir incluso en entornos donde las condiciones pueden cambiar de repente y drásticamente (Dion y Nautiyal, 2008). Los microorganismos tienen la capacidad más alta de todas las formas de vida para adaptarse a entornos extremos y estresantes (Torsvik y Øvreås, 2008). Esto se debe a que producen biomoléculas denominadas extremozimas que presentan actividad catalítica bajo condiciones extremas (Mirete *et al.*, 2016). Los extremófilos y sus macromoléculas han desarrollado mecanismos de adaptación a condiciones extremas físico-químicas, estudios sobre la adaptabilidad de los microorganismos a condiciones adversas, indican que estos emplean una variedad de mecanismos para proteger sus macromoléculas; tales como, cambios en la composición lipídica de la membrana, moléculas específicas, modificaciones genéticas en la secuencia de aminoácidos de las proteínas. Se ha demostrado que microorganismos hipertermófilos tienen un alto contenido de Guanina(G) y Citosina (C), que protege el DNA de la termodegradación debido a la exposición a temperaturas extremas (Huang *et al.*, 2016). Por lo tanto, la capacidad de microorganismos para sobrevivir a condiciones adversas se debe posiblemente a una combinación en la composición química de sus macromoléculas, al ambiente intracelular en el cual residen, y a las vías bioquímicas para reparar el daño debido a la exposición a condiciones extremas (Huang *et al.*, 2016; Solanki y Gupta, 2013).

Los organismos que viven en condiciones extremas se dividen en diferentes categorías de acuerdo con la naturaleza de su adaptación (Tabla 1). Se clasifican como termo- (alta temperatura), psychro- (baja temperatura), halo- (alta sal), acido- o alcalino (pH extremo bajo o alto) y xero- (baja actividad de agua). El sufijo

-phile se usa para aquellos que requieren las condiciones extremas para el crecimiento, y -trofia para aquellos que pueden tolerar la condición extrema. Estas designaciones no son exclusivas, porque dos o más factores pueden ser extremos en el mismo entorno, como condiciones independientes o interrelacionadas. Por lo tanto, los organismos pueden pertenecer a múltiples categorías, por ejemplo, se consideran tanto psicrófilas como xerófilas (Dion y Nautiyal, 2008).

Tabla 1. Clasificación de los microorganismos en función de su temperatura óptima de crecimiento.

Temperatura	Descripción
Hipertermófilos	Su temperatura óptima de crecimiento está por encima de los 80°C y el máximo crecimiento de cultivos puros se ha llegado a dar entre 110 y 113°C
Termófilos	Crece por encima de los 45°C
Mesófilos	Temperatura óptima alrededor de 37°C. Frecuentemente son capaces de crecer en rangos alrededor de 25 a 45°C.
Psicrófilos	Capaces de crecer por debajo de 5°C y con temperatura máxima de 20°C. Frecuentemente son capaces de crecer en rangos alrededor de 10°C.
Psicrófilos facultativos	Temperatura óptima de 15°C llegando a alcanzar los 20°C y también capaces de crecer hasta por debajo de 0°C.

Fuente: Ramírez *et al.*, 2006.

5. ANTECEDENTES

La diversidad microbiana en ecosistemas de Alta montaña ha sido evaluada en recientes años. Al respecto, se encuentran los reportes de Moratto et al., (2005) quienes evaluaron la abundancia de hongos solubilizadores de fosfato y bacterias diazotróficas en el páramo de Guerrero en el municipio de Zipaquirá (Cundinamarca). Los autores realizaron la identificación de los microorganismos mediante claves taxonómicas (para los hongos) y pruebas bioquímicas (para las bacterias diazotróficas). Las pruebas bioquímicas revelaron especies de los géneros *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Pseudomonas* y *Derxia*.

Por otro lado, Bernal et al., (2006) reportan microorganismos celulolíticos cultivables y endomicorrizas en hojarasca de bosque del páramo de Guerrero, los cuales fueron identificados mediante claves taxonómicas y pruebas bioquímicas. Encontraron con mayor frecuencia a los géneros *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Penicillium*, *Rhodotorula* y aislaron una cepa de *Cladosporium* sp. en un medio selectivo con carboximetil celulosa. Así mismo, encontraron ocho morfotipos de endomicorrizas, entre los cuales predominaron especies de *Glomus* y *Acaulospora*.

Benavides y Hermida (2008), realizaron aislamiento e identificación de flora nativa del suelo de los páramos de Cruz Verde y Guasca; obteniendo un alto porcentaje de bacterias Gram positivas; mediante el uso de pruebas bioquímicas y medios de cultivo selectivos, identificaron 40 cepas bacterianas correspondientes a los géneros: *Ampibacillus*, *Bacillus*, *Brochothrix*, *Caryophanon*, *Kurthia*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Sacharococeus*, *Sarciana*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina*, *Staphylococcus* y *Trichococcus*. Siendo los géneros *Bacillus* y *Lactobacillus* los más predominantes.

Otros estudios enfocados al análisis de la funcionalidad y diversidad microbiana en suelos, mediante aproximación metagenómica como el reportado por Suárez (2010), revelan tanto a nivel funcional como de diversidad taxonómica, el gran potencial de los suelos para estudios de metagenómica y bioprospección. En este estudio se obtuvieron 1728 clones para librerías de suelo orgánico y 5568 para la librería tradicional, en el tamizaje funcional revelaron la presencia de 22 clones con actividad celulótica, 4 con actividad proteolítica y 14 con actividad potencial en la solubilización de fosfato. En los análisis de diversidad a nivel taxonómico, encontraron la presencia de bacterias pertenecientes en su mayoría a los grupos de α - β -y Proteobacterias, Actinobacterias y otras bacterias no identificadas.

Por su parte, Franco (2010) evaluó la actividad lipolítica de 43 cepas bacterianas aisladas de suelo del Parque Natural Nacional los Nevados, de las cuales, cuatro presentaron actividad lipolítica en diferentes sustratos lipídicos con ácidos grasos.

Estudios realizados para el análisis de la composición taxonómica y funcional, como el reportado por Montaña *et al.*, (2011), revelan que las secuencias metagenómicas de clones obtenidos, corresponden a bacterias pertenecientes al phylum *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Acidobacteria* y entre los órdenes más representativos encontraron *Actinomycetales*, *Rhizobiales*, *Burkholderiales* y *Mixococcales*, con un gran número de secuencias del género *Microbacterium*, *Frankia*, *Streptomyces* y *Bradyrhizobium*. La mayoría de secuencias fueron asociadas con metabolitos como carbohidratos, proteínas y lípidos y con funciones catalíticas de importancia biotecnológica como: fosfatasas, glucotransferasas, deshidrogenasas, metiltransferasas y deshidratasas.

Por otra parte, Palacios (2012) evaluó la diversidad de bacterias con actividad lipolíticas, logrando aislar 43 cepas, a partir de un cultivo microbiano enriquecido de muestras de suelo de páramo y glaciar del Parque Nacional Natural los Nevados El tamizaje de las cepas sobre medios con tributirina y aceite de oliva, le

permitió identificar cualitativamente su capacidad lipolítica. Con el fin de estimar de forma preliminar la diversidad de bacterias lipolíticas cultivables de ambos ecosistemas, realizó un análisis de restricción del gen ADNr 16S (ARDRA) y la secuenciación del gen completo. Los patrones de digestión obtenidos con las enzimas *AluI*, *HpaII* y *RsaI* dieron una aproximación preliminar sobre la diversidad, mientras que el análisis de las secuencias le permitió por un lado identificar bacterias psicrófilas y por otro estimar de manera más precisa la diversidad en los dos ecosistemas. Empleando estas dos aproximaciones, observó una mayor diversidad en el enriquecimiento de la muestra de glaciar. Sin embargo, en los dos casos la mayoría de bacterias identificadas pertenecen al *Phylum* proteobacteria y los géneros representados corresponden a: *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia* y *Aeromonas*. La evaluación cualitativa de actividad lipolítica en medios suplementados con tributirina y aceite de oliva, mostró que las cepas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* y *Ralstonia*, presentan una mayor capacidad de hidrólisis de sustratos lipídicos.

En un estudio posterior Avelladena y Torres (2013), realizaron una caracterización de la biodiversidad de grupos funcionales de microorganismos en el PNNN. Evaluaron el efecto del cultivo de papa y ganadería sobre la diversidad microbiana y la calidad del suelo, en este estudio se reportaron 1060 morfotipos microbianos (bacterias y hongos) aislados de medios selectivos para grupos funcionales del suelo (fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fosfato y celulíticos). Las bacterias identificadas pertenecen a cuatro *phylum* (*Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Firmicutes*) y los hongos identificados pertenecen a cuatro *phylum* (*Ascomycota*, *Zygomycota*, *Basidiomycota* y *Glomeromycota*).

En el 2014, Lizarazo-Medina y Gómez-Vazques, determinaron en dos páramos de Antioquia poblaciones microbianas cultivables de importancia funcional como dinamizadora de nutrientes en el suelo rizosférico de *Espeletia* spp, encontraron representantes de los *phyla* Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria.

Establecieron la presencia de microbiota fúngica y bacteriana con capacidad de degradar materia orgánica (celulosa) y fósforo, funciones que posiblemente contribuye al mantenimiento de la estructura del suelo y de la diversidad vegetal de estos ecosistemas.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

- Describir la microbiota bacteriana cultivable presente en suelo de ambientes extremos en zona de Bosque Alto Andino- Páramo, Parque Natural Nacional Los Nevados-Colombia.

6.2 Objetivos específicos

- Cultivar bacterias provenientes de suelo de ambientes extremos.
- Describir las bacterias cultivables de suelo de ambientes extremos (Bosque Alto Andino-páramo).
- Evaluar la prevalencia bacteriana en las diferentes épocas muestreadas.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 TIPO DE ESTUDIO

Este estudio es de tipo experimental. En el cual se utilizaron técnicas dependientes de cultivo, se utilizó la técnica de dilución en tubo, y técnica de dispersión sobre agar para recuperación de microorganismos. Se probaron diferentes tratamientos correspondientes a combinaciones entre pH y temperatura (Tabla 2), se realizaron pruebas bioquímicas manuales y semiautomatizadas para la identificación de los morfotipos aislados, finalmente se determinó la diversidad bacteriana en cada época muestreada.

Tabla 2. Tratamientos correspondientes a la combinación entre las variables A (temperatura) y B (pH) en estudio para las muestras de suelo de ZTBP.

TRATAMIENTO	VARIABLE A	VARIABLE B
	Temperatura °C	pH
1	20	6.0
	20	2.6
2	27	6.0
	27	2.6
3	32	6.0
	32	2.6
4	37	6.0
	37	2.6

7.2 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Los análisis fueron realizados en el Laboratorio de Genómica y Biología Molecular BIMAC de la Universidad del Cauca, enmarcado dentro del proyecto de

investigación Doctoral titulado “BACTERIAS DE AMBIENTES EXTREMOS COMO POSIBLES BIOINDICADORES DE CAMBIO AMBIENTAL”. Las muestras fueron recolectadas en dos épocas del año, correspondiente a la época de lluvia y época seca, en el Parque Natural Nacional Los Nevados en la zona de amortiguación Villa María en el departamento de Caldas, Colombia. A continuación se presenta la denominación de las muestras (M) empleadas en este estudio (figura 2):

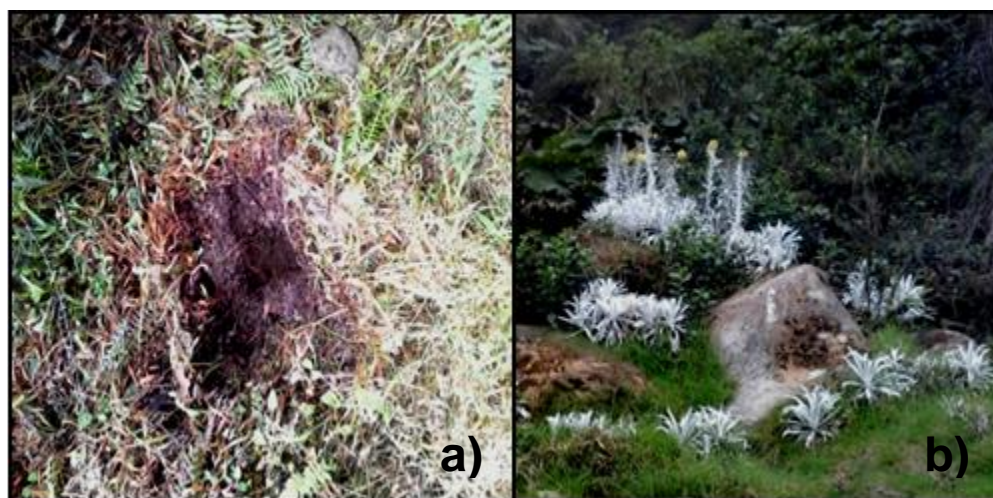


Figura 2. Imágenes de los sitio muestreados. a) M1: Sustrato de suelo en área de transición bosque-páramo, Época de lluvia, b) M2: Sustrato de suelo en área de transición bosque-páramo, Época de seca. Fuente: Nilza Velasco Palomino.

7.3 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

7.3.1 Mantenimiento de las muestras. Las muestras fueron conservadas en oscuridad a 4°C, fueron colocadas en bolsas plásticas amarradas en forma holgada, previniendo que se presentaran condiciones anaeróbicas en el fondo de estas.

7.3.2 Determinación del pH de las muestras. El pH del suelo se midió con un potenciómetro, pesando 10g de suelo los que fueron colocados en un vaso de precipitación de 100 ml. Luego se añadió 25 ml de agua destilada, y se mezclaron por un lapso de 5 minutos. Las muestras se dejaron en reposo por una hora, y una vez transcurrido ese tiempo, se procedió a tomar las lecturas de pH correspondientes de las muestras (Gavilánez, 2013).

7.3.3 Cultivo primario. Se aplicó la técnica de cultivo en líquido para el preenriquecimiento de las muestras, para ello se pesó 1g de suelo correspondiente a cada muestra, el cual fue adicionado en un tubo falcón que contenía 9 ml de caldo nutritivo (Benavides y Hermida, 2008), al cual se ajustó previamente su pH (2.6 y 6) con ácido clorhídrico (HCl) estéril al 5%. Los medios inoculados fueron incubados en un shaker orbital Thomas Scientific (200 rpm) a temperaturas en el rango de 20°C a 37°C, por 24 a 48 horas. El crecimiento fue determinado visualmente por la presencia de turbidez.

7.3.4 Siembra en placa. A partir de la primera dilución (pre-enriquecimiento de las muestras) se hicieron diluciones seriadas con base 10 en agua peptonada 0.1%, desde la dilución 10^{-1} - 10^{-4} , las cuales se agitaron por cinco minutos, para luego realizar siembra masiva en superficie (0,1mL) en el medio de cultivo Agar Nutritivo-Becton Dickinson (Sanz, 2011). Se sembró en las diluciones 10^{-1} y 10^{-4} , por triplicado. Posteriormente, se llevaron a incubar a diferentes temperaturas (20°C, 27°C, 32°C, 37°C), se realizó lecturas cada 24 horas por 5 a 8 días,. La determinación de crecimiento bacteriano se realizó observando la presencia o ausencia de colonias (Figura 3).

7.3.5 Determinación de la población y diversidad bacteriana. Se realizó conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). De acuerdo a Prado *et al.*, (2013) el número de UFC por gramo de suelo fue calculado en un rango entre 30 hasta 300 colonias, usando la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/g} = \frac{N \times \text{ID}}{V}$$

Dónde:

N= número de colonias

ID: Inverso de la Dilución en la cual se contó

Vi: volumen inoculado, mililitros

7.3.6 Aislamiento y purificación bacteriana. A partir de las cepas recuperadas, se seleccionaron los diferentes morfotipos bacterianos de acuerdo a sus características macroscópicas y se sembraron por estría y agotamiento en agar nutritivo, las placas inoculadas fueron incubadas por un periodo de 18-24 horas, para obtener cultivos axénicos se hicieron sucesivas resiembras hasta obtener cepas puras para su respectiva identificación (Figura 3).

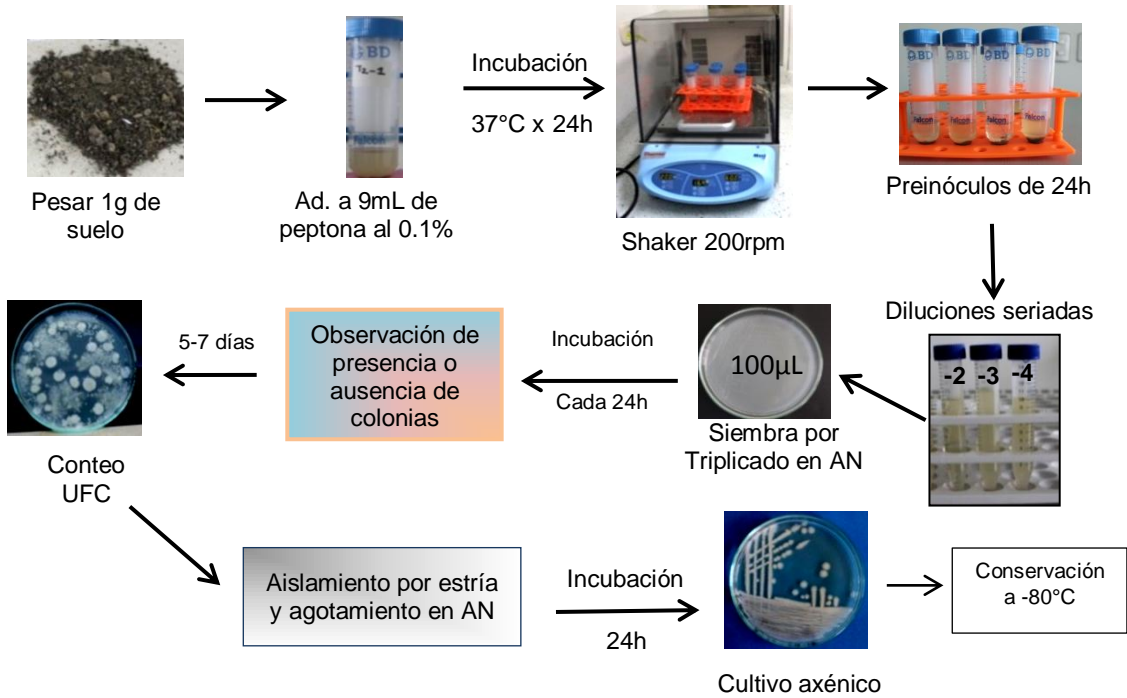


Figura 3. Esquema de cultivo de bacterias a partir de muestra de suelo. Fuente: Elaboración propia.

7.4 CARACTERIZACIÓN BACTERIANA

7.4.1 Caracterización macroscópica. Los cultivos puros obtenidos se describieron de acuerdo a la morfología de las colonias. Las características generales fueron descritas de acuerdo a su forma, elevación, margen y color (Gavilánez, 2013).

7.4.2 Caracterización microscópica

7.4.2.1 Tinción de Gram. Se realizó tinción de Gram de acuerdo a la metodología de Hucker (Doetsch., 1981). Se dispuso una muestra de la colonia pura sobre una lámina portaobjeto con una gota de solución salina al 0.85%, se dejó secar a temperatura ambiente y se fijó sobre el mechero, se tiñó por 1 minuto con Cristal Violeta y luego se lavó con agua destilada, se cubrió con una solución de Lugol durante 1 minuto y nuevamente se lavó con agua destilada y posteriormente se adicionó una solución de alcohol-acetona en relación 1:3, se lavó con abundante agua y se cubrió con Safranina durante 20 segundos, posteriormente se lavó con agua destilada y finalmente se realizó el secado a temperatura ambiente, luego cada una de las placas se hizo correspondiente descripción microscópica bajo lente de inmersión(100x).

7.4.2.2 Tinción de endosporas. Se aplicó la técnica de Wirtz, modificada por Shaefer y Fulton, se procedió a extender y fijar una muestra de la cepa bacteriana sobre un portaobjetos limpio, desengrasado y seco, luego se vertió la solución de verde de Malaquita al 5% sobre la preparación, se calentó hasta emisión de vapores durante 5 minutos sin dejar hervir, y se lavó con agua destilada. Posteriormente se coloreo por 30 segundos con la solución de Safranina al 0.5%, y se lavó con agua; finalmente las placas se dejaron secar y se observaron al microscopio con objetivo de inmersión. Las esporas se coloreaban en verde y los cuerpos de las bacterias en rojo. La posición y forma de la endospora (Figura 4) se determinó según el protocolo de Márquez (2007).

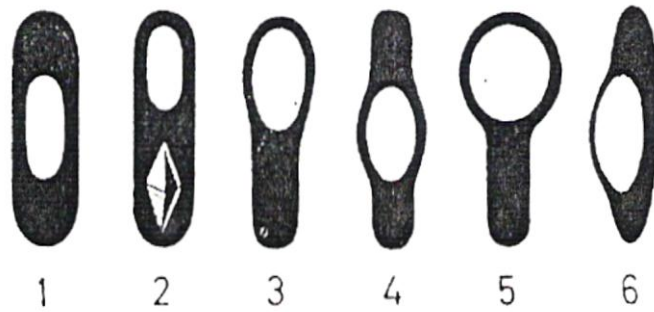


Figura 4. Diagrama de endosporas no deformantes y deformantes de la célula. De izquierda a derecha 1 y 2 no deformantes, 3, 4, 5 y 6 deformantes.

7.4.3 Caracterización Bioquímica

7.4.3.1 Pruebas bioquímicas Manuales. Las bioquímicas se realizaron siguiendo el procedimiento de MacFaddin, (2004). Se realizaron las pruebas de oxidasa, catalasa, citrato, SIM (H₂S, Indol, Motilidad), LIA (Lisina, Hierro Agar), TSI (Triple Azucar Hierro), OF (Oxidación-Fermentación), Voges Proskauer, Rojo de Metilo, Nitratos, Urea, Gelatina, Almidón, Glucosa, Sacarosa, Maltosa, Manitol, Fructosa, Sorbitol, Inositol, Sucrosa, Galactosa, Lactosa, para determinar el metabolismo de los microorganismos aislados.

Cada prueba bioquímica fue incubada a 35°C por 24 horas, pasado ese tiempo se observaron los resultados de acuerdo a cada reacción bioquímica. Para cada prueba bioquímica se realizaron controles positivos y negativos utilizando cepas American Type Culture Collection (ATCC) obtenidas del laboratorio de microbiología de la facultad Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca, (Tabla 3). Los resultados bioquímicos de cada morfotipo aislado, fueron analizados mediante claves taxonómicas utilizando el manual de identificación Bergey's. (Breed *et al.*, 1957; Breed, Murray y Parker, 1948) adicionalmente los resultados fueron analizados utilizando el Software avanzado de identificación bacteriana ABIS online.

Tabla 3. Control positivo y negativo para cada prueba bioquímica.

BIOQUIMICA	CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO
Voges Proskauer	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
Rojo de Metilo	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	No inoculado
TSI	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	No inoculado
Reduccion Nitratos	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	No inoculado
Citrato	<i>Salmonela typhimorium</i> ATCC 14028	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
Gelatina	<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	No inoculado
Almidón		<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853
LIA	<i>Salmonela typhimorium</i> ATCC 14028	No inoculado
Ureasa	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
Catalasa	<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	No inoculado
Oxidasa	<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	No inoculado
SIM	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	No inoculado
NaCl 7%	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	No inoculado

Fermentación de carbohidratos		
BIOQUIMICA	CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO
Glucosa	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	No inoculado
Sucrosa	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25923	No inoculado
Galactosa	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25924	No inoculado
Fructuosa	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25925	No inoculado
Maltosa	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25926	No inoculado
Lactosa	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25927	No inoculado
Inositol		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25928
Sorbitol	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25929	No inoculado
Manitol	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25930	No inoculado

7.4.3.2 Pruebas bioquímicas semiautomatizadas. Se utilizaron los sistemas de identificación API 20E para bacterias Gram negativas, y el sistema estandarizado API STAPH para los géneros *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Kocuria*. El procedimiento de siembra se realizó de acuerdo al fabricante (BioMérieux).

Se realizaron suspensiones a partir de colonias puras aisladas, en 5mL de agua destilada estéril para el sistema API 20 E y en 5mL de médium API Staph para el sistema API Staph, hasta obtener una turbidez igual al patrón 3 y 0.5 de McFarland respectivamente. Luego se transfirieron con la ayuda de una micropipeta 100µL en cada uno de los pocillos evitando la formación de burbujas. Las tiras fueron colocadas en las cámaras de incubación previamente humedecidas para proporcionar unas atmosfera húmeda, siendo llevadas a 35°C por 18 a 24 horas. La lectura de los resultados se llevó a cabo por comparación de colores de cada pocillo con los de la tabla de lectura API 20E y API STAPH; del conjunto de reacciones y resultados se obtuvo un perfil número de 7 cifras, el cual se introdujo en el software de identificación *Apiweb*TM Stand alone V 1.2.1, dando como resultado la identificación del microorganismo.

7.5 CONSERVACIÓN DE CEPAS

Las cepas aisladas se conservaron mediante método de congelación (-80°C) se utilizó glicerol como criopreservante (Pérez et al., 2010), se trabajó con tubos eppendorf de capacidad 1.5 mL; debido a la expansión por efecto de la congelación se manejó un volumen de trabajo de 1mL de mezcla para cada vial (Benavides y Hermida., 2008). A partir de los cultivos puros se hizo siembra en medio líquido (Caldo Nutritivo-Becton Dickinson), los cuales se incubaron por un periodo de 24 horas, el crecimiento se evaluó por la presencia de turbidez en el medio, posteriormente se tomó una cantidad de suspensión bacteriana y de glicerol siguiendo una relación 1:1 y se depositarán en los tubos, se agitaron y sellaron con papel parafilm, para finalmente ser almacenados a -80°C en un ultracongelador Thermo scientific para su preservación a largo plazo.

7.6 ANÁLISIS DE DATOS

Los datos correspondientes a las UFC/g, al no cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, se analizaron mediante pruebas no-paramétricas de Mann-Whitney para los datos de pH y Kruskal-Wallis para los datos de temperatura, con un nivel de significancia $p < 0.05$. Los datos se analizaron en el software estadístico IBM SPSS Statistics 24.

Con los resultados de la caracterización de la morfología macro y microscopica, se construyó una base de datos, en código binario, con el número de pruebas o características estudiadas. Posteriormente la información fue procesada en el software estadístico Past3 en el que se calcularon los porcentajes de similitud de Jaccard entre las bacterias estudiadas. Finalmente, con la ayuda del mismo programa se procedió a obtener un dendrograma basado en la similitud entre los microorganismos. Una vez obtenido éste gráfico, se procedió a identificar los grupos fenotípicos.

A partir de los datos obtenidos en las diversas pruebas bioquímicas, se determinó la diversidad funcional bacteriana de las muestras de suelo, se evaluaron mediante análisis multivariado (cluster de datos), a través del algoritmo de agrupación simple o vecino más cercano, para la obtención de grupos de bacterias con las mismas características funcionales. La medida utilizada fue la distancia euclidiana. Las cepas cuyas distancias fue cero, se consideraron integrantes del mismo grupo funcional. Estos datos fueron usados para el cálculo del índice de diversidad funcional (IDF) y el índice de importancia (Pi) propuestas por Ramos (1996) en Zamora *et al.*, (2012).

8. RESULTADOS

8.1 DETERMINACIÓN DE pH

En la tabla 4, se muestra los datos correspondientes a los valores de pH para cada sustrato en las diferentes épocas, los valores obtenidos indican que los suelos son fuertemente ácidos.

Tabla 4. Resultado del pH determinado para las dos muestras que fueron utilizadas en este estudio.

MUESTRA	pH
Suelo bosque época de lluvia	4.62
Suelo bosque época seca	4.61

8.2 DETERMINACIÓN DE LA POBLACIÓN Y DIVERSIDAD BACTERIANA

8.2.1 Época de lluvia.

8.2.1.1 influencia de la Temperatura sobre las UFC. En la Tabla 5 se muestra la variación en la abundancia de UFC/g (expresadas como $UFC \times 10^3$) a diferentes temperaturas. Estas variaciones sin evaluar la interacción con las condiciones de pH del diseño, no presentan una diferencia significativa entre ellas mismas ($p=0,08$). Sin embargo se observa un mayor número de UFC en la temperatura más baja 20°C, seguida de la temperatura de 32°C (Figura 5).

Tabla 5. Resultados del número de UFC/g, obtenidos a diferentes temperaturas (20, 27, 32, 37) sin distinguir el pH. Época de lluvia.

Temperatura	20	27	32	37
UFCx10 ³	16166,66±5580,28	4211,65±2138,95	11266,66±5090,75	1200,00±570,96

Resultados expresados como la Media ± Error Estándar.

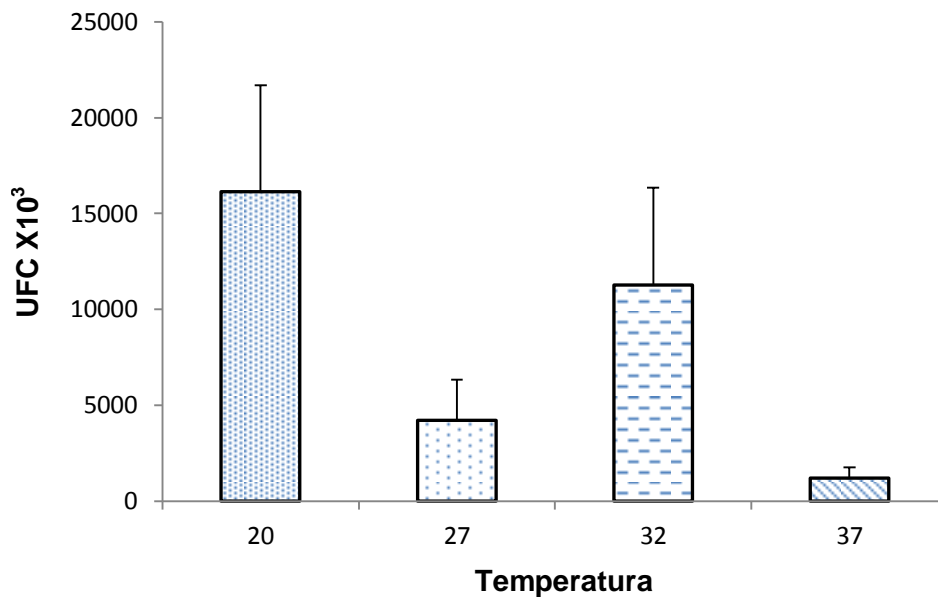


Figura 5. Abundancia de UFC/g, obtenidas en cuatro temperaturas (20, 27, 32, 37). Época de lluvia.

8.2.1.2 Influencia del pH sobre la abundancia de UFC. El pH causó variabilidad en el número de unidades formadoras de colonias (UFC/g) (Tabla 6), observándose diferencias significativas entre los dos valores de pH (2,6 y 6) para todas las condiciones de temperatura del diseño ($U= 0,0001$, $p<0,05$).

Tabla 6. Número de UFCx10³, obtenidas en dos condiciones de pH (2.6 y 6)

pH	2.6	6
UFCx10 ³	997.4917±582.001	15400.00±3246.55

Resultados expresados como la Media ± el Error estándar.

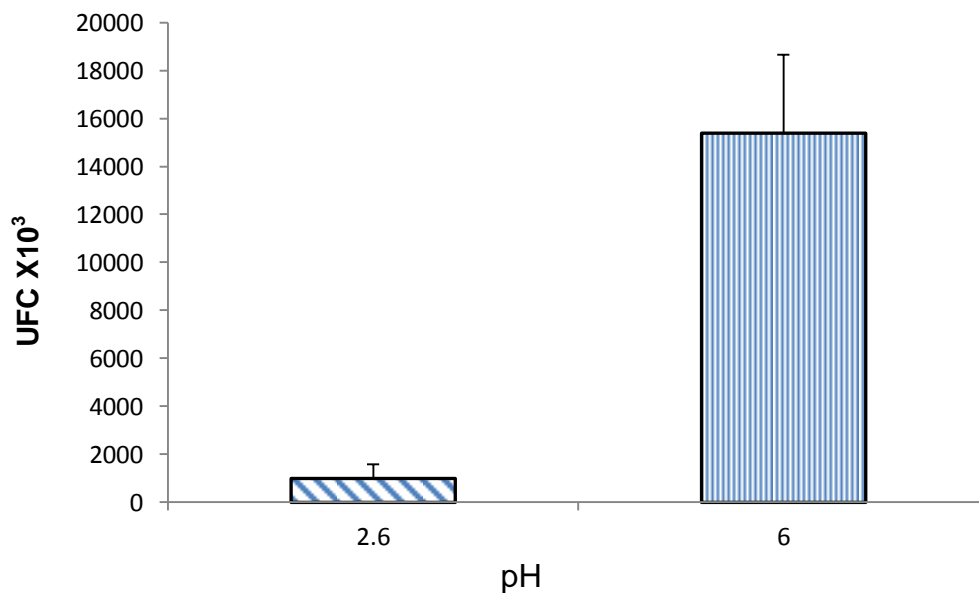


Figura 6. Abundancia de UFC obtenidas en dos condiciones de pH (2.6 y 6). Época de lluvia.

8.2.1.3 Influencia de la interacción entre T° y pH sobre la abundancia de UFC.

En la Tabla 7 se muestra los valores de las UFC obtenidas para cada combinación entre T° y pH. Se puede apreciar que en las combinaciones entre pH 6 y temperatura 20 y 32°C hay mayor abundancia de UFC (28266.6 y 22533,33 respectivamente), bajo estas condiciones de temperatura vs. pH 6 (Figura 7), se evidenciaron diferencias significativas en el número de UFC/g ($p= 0.018$; $p<0.05$) entre todas las temperaturas, excepto entre 20 y 32 °C ($U=0.12$; $p<0.05$). Mientras

que para las combinaciones de temperatura con pH 2.6, la abundancia de UFC se ve favorecida por la temperatura más baja (20°C) obteniéndose un mayor número de UFC(3966.66) ,no se presentó crecimiento de colonias a 32 y 37 °C ,bajo esta condición (T° vs pH 2.6) se hallaron diferencias significativas en el número de UFC/g (Figura 8) entre las cuatro temperaturas (p=0,013; p>0,05).

Tabla 7. Resultados de la abundancia de UFC para cada combinación entre Temperatura y pH. Época de lluvia

pH \ T°	T°			
	20	27	32	37
2.6	3966.66±1254.76	23.300±2,651	0	0
6	28266.66±2549.72	8400.0±2309.40	22533.33±1625.14	2400.0±435.88

Resultados expresados como la Media ± el Error estándar.

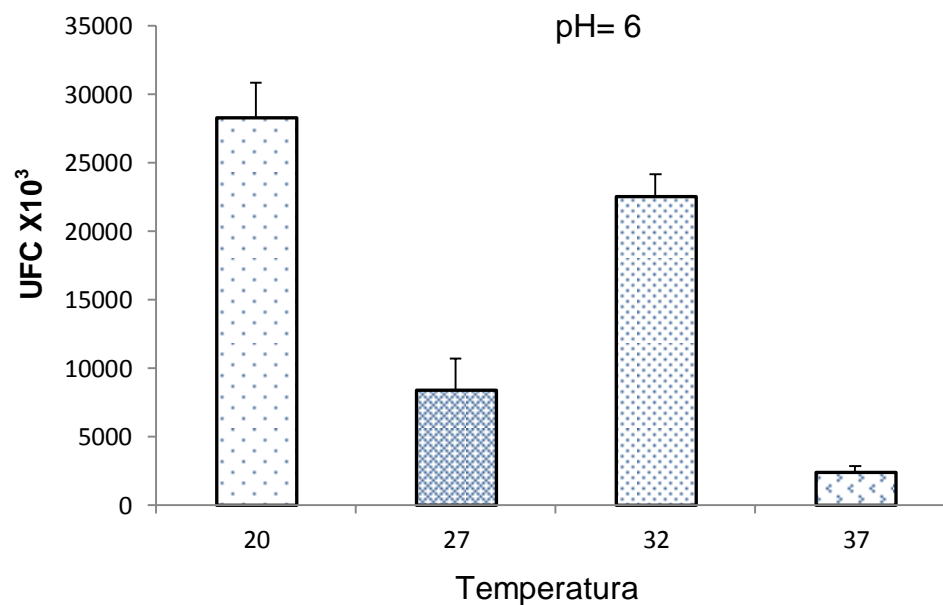


Figura 7. Número de UFC/g obtenidas en las diferentes condiciones de temperatura a pH 6. Época de lluvia.

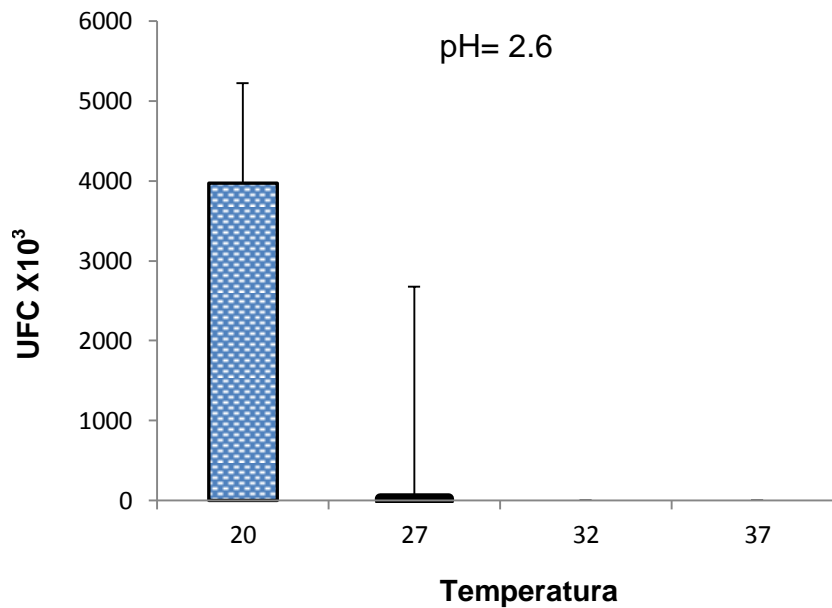


Figura 8. Número de UFC/g obtenidas en las diferentes condiciones de temperatura a pH 2.6. Época de lluvia.

8.2.2 Época seca.

8.2.2.1 influencia de la Temperatura sobre las UFC. En la Tabla 8 se muestra la variación en la abundancia de UFC/g (UFCx10³) a diferentes temperaturas. Estas variaciones (sin evaluar la interacción con las condiciones de pH del diseño) no presentan una diferencia significativa entre ellas mismas ($p= 0,97$; $p>0.05$). Sin embargo se observa un mayor número de UFC en la temperatura más alta 37°C (14016.6 UFC/g), seguida de la temperatura de 32°C (9350 UFC/g) (Figura 9).

Tabla 8. Resultados del número de UFC/g, obtenidos a diferentes temperaturas (20, 27, 32, 37) sin distinguir el pH. Época seca

Temperatura	20	27	32	37
UFC/g	7384.0167± 3305.28	3159.3167± 1499.15	9350± 4290.59	14016.666± 6300.12

Resultados expresados como la Media ± el Error estándar.

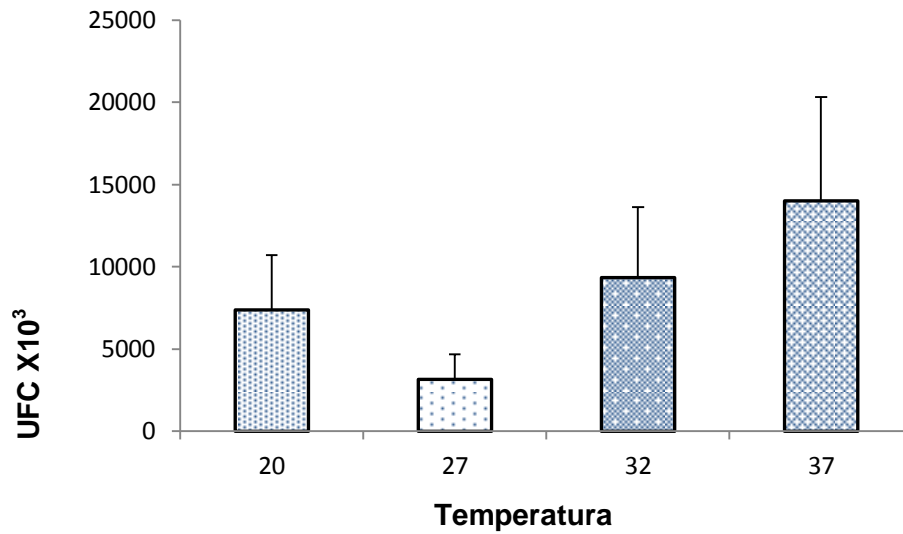


Figura 9. Abundancia de UFC/g, obtenidas en cuatro temperaturas (20, 27,32, 37), para la muestra de suelo en época seca

8.2.2.2 Influencia del pH sobre la abundancia de UFC. El pH causo variabilidad en el número de unidades formadoras de colonias (UFC/g) (Tabla 9), observándose diferencias significativas entre los dos valores de pH (2,6 y 6) para todas las condiciones de temperatura del diseño ($U= 0,000$; $p<0,05$)

Tabla 9. Número de UFCx10³, obtenidas en dos condiciones de pH (2.6 y 6)

pH	2.6	6
UFC/g	5.0000±3.088	16950.0±2432.31

Resultados expresados como la Media ± el Error estándar.

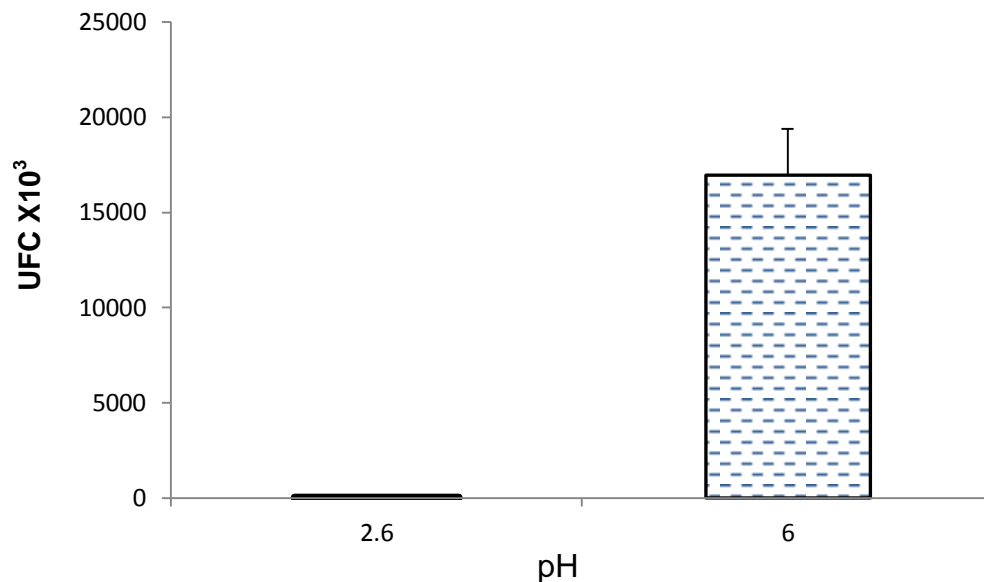


Figura 10. Abundancia de UFC obtenidas en dos condiciones de pH (2.6 y 6), a partir de la muestra de suelo en época seca.

8.2.2.3 Influencia de la interacción entre T° y pH sobre la abundancia de UFC.

En la Tabla 10 se muestra los valores de las UFC obtenidas para cada combinación entre T° y pH. Se puede apreciar que en las combinaciones entre pH 6 y temperatura 37 y 32°C hay mayor abundancia de UFC (28033.33 y 18700 respectivamente). Bajo las condiciones de temperatura evaluadas vs. pH 6 (Figura 11), se evidenciaron diferencias significativas en el número de UFC/g ($p= 0.02$; $p<0.05$) entre todas las temperaturas, excepto entre 20 y 32 °C ($U=0.27$; $p>0.05$). Mientras que para las combinaciones de temperatura con pH 2.6, la abundancia de UFC se ve favorecida por la temperatura de 27°C, obteniéndose un mayor número de UFC (18.6333). Bajo estas condiciones (T° vs pH 2.6), se hallaron diferencias significativas en el número de UFC/g (Figura 12) entre las todas las temperaturas ($p=0,014$; $p>0,05$), excepto entre 32 y 37°C ($U=1.00$; $p>0.05$), puesto que no se presentó crecimiento de colonias.

Tabla 10. Resultados de la abundancia de UFC para cada combinación entre Temperatura y pH en época seca

T° pH	20	27	32	37
2.6	1.3667±0.717	18.6333±9.206	0.00	0.00
6	14766.66±348.01	6300±1171.89	18700±2150.19	28033.33±1411.06

Resultados expresados como la Media ± el Error estándar.

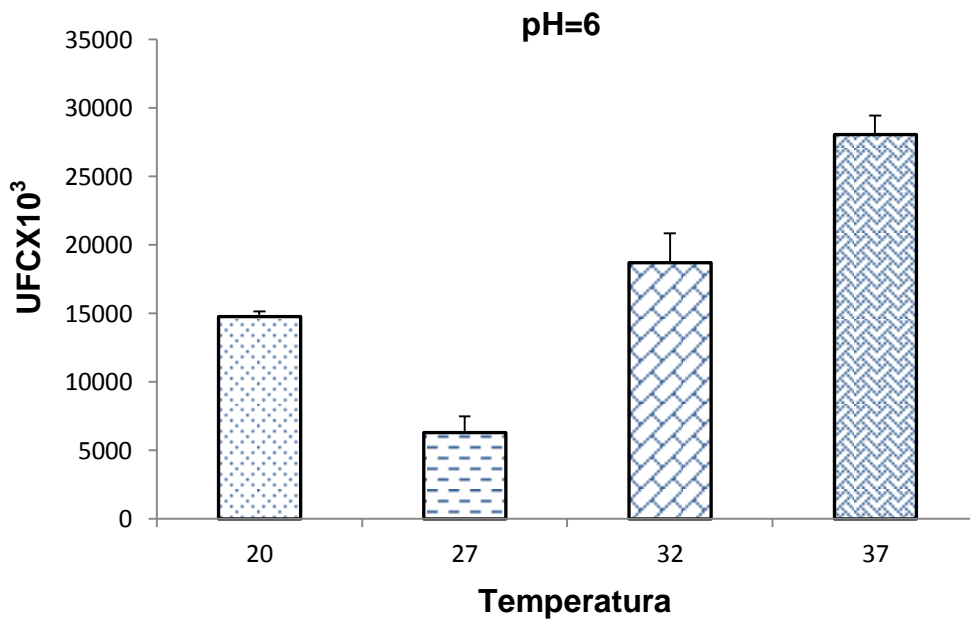


Figura 11. Número de UFC/g obtenidas en las diferentes condiciones de temperatura a pH 6. Época seca.

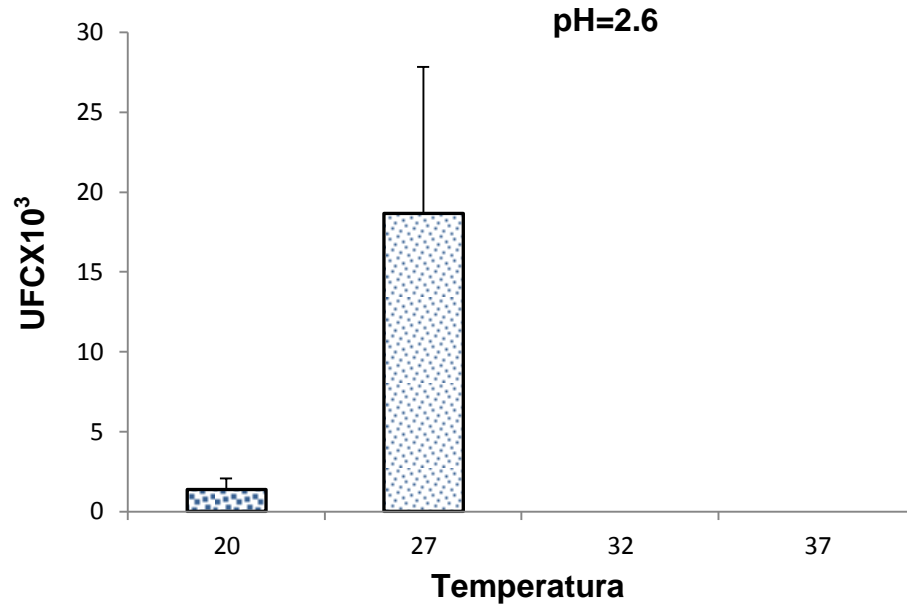


Figura 12. Número de UFC/g obtenidas en las diferentes condiciones de temperatura a pH 2.6. Época seca.

8.2.3 Densidad bacteriana en las dos épocas de muestreo. En la Tabla 11 se muestra el número total de UFC/g (datos expresados como UFCx10³), obtenidas en cada época de muestreo (lluviosa y seca) en suelos de ZTBP. No se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.317$; $p>0.05$) entre la densidad de bacterias en las dos épocas. Sin embargo la época seca presento un mayor número (8477.59) de UFC (Figura 13).

Tabla 11. Densidad de bacterias para cada una de las épocas de muestreo

Época	lluvia	seca
UFCX10³	8198.7458±2203.6	8477.5±2129.7

Resultados expresados como la Media ± el Error estándar.

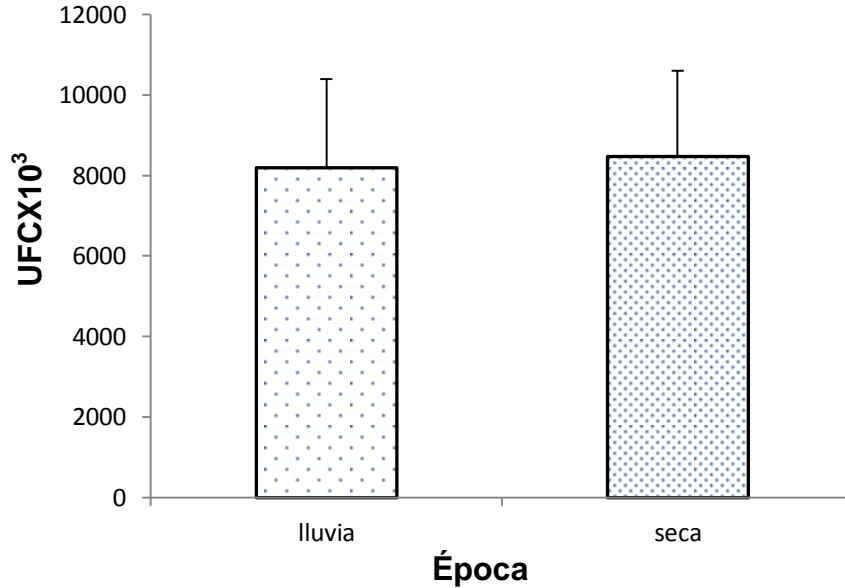


Figura 13. Promedio \pm el Error estándar de la densidad de UFC en suelos de ZTBP en dos épocas (lluvia y seca).

8.3 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN BACTERIANA

A partir de las dos muestras se logró el aislamiento y purificación de 36 cepa, 18 corresponden a la muestra de bosque en época de lluvia, 18 a la muestra de bosque en época seca. En casi todas las muestras de suelo en donde se logró el aislamiento bacteriano el pH fue de 6. En la Figura 14 se muestran algunos ejemplos de aislamientos obtenidos a partir del procesamiento de las muestras en estudio.

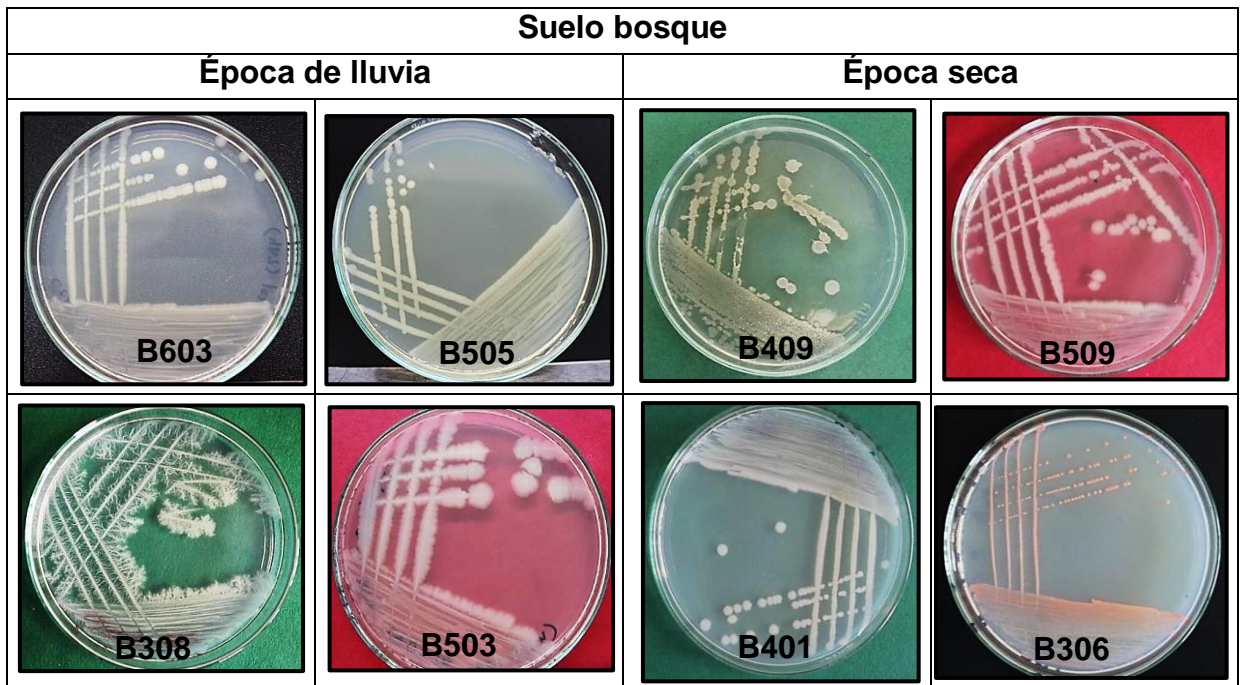


Figura 14. Aislamientos de cepas bacterianas axénicas, obtenidas a partir de muestra de suelo de ZTBP en dos épocas diferentes (lluvia y seca).

8.4 CARACTERIZACIÓN BACTERIANA

8.4.1 **Caracterización macroscópica.** En la Tabla 12 se muestran las características morfológicas de los morfotipos recuperados en las muestras de suelo de ZTBP en las dos épocas (lluvia y seca). Los 36 aislamientos produjeron colonias generalmente con color blanco y beige en diferentes tonalidades, de forma circular a irregular con bordes ovalados, irregulares y lisos. (Figura 15). En las dos épocas de muestreo predominaron las colonias en forma circular, con borde liso, planas y superficie lisa. Por otra parte, el análisis de cluster a partir de las características morfológicas de los aislamientos, para la época de lluvia mostro la formación de 18 grupos fenotípicos. En la Figura 16 se puede apreciar que el mayor coeficiente de similitud (0,73) está dado por las cepas 303 y 305. Mientras que en la época seca se obtuvieron grupos fenotípicos con un coeficiente de similitud del 0,82 (Figura 17).

Tabla 12. Características morfológicas macro y microscópicas de las cepas bacterianas aisladas a partir de muestra de suelo en ZTBP en época de lluvia y época seca.

CEPA	EPOCA	FORMA	MARGEN	ELEVACION	COLOR	SUPERFICIE	GRAM	FORMA	ENDOSPORA	TEMPERATURA °C	pH
B505	lluvia	circular	Liso	elevada	beige	lisa	+	bacilo	+	32	6
B603	lluvia	circular	Irregular	elevada	beige con centro más oscuro	lisa	+	bacilo	+	37	6
B604	lluvia	circular-irregular	Ondulado	plana	blanco-crema	lisa	+	bacilo	+	37	6
B605	lluvia	circular	Liso	plana	transparente	lisa	+	bacilo	+	37	6
B607	lluvia	circular	Liso	plana	beige claro translucido	granulosa	+	bacilo	+	37	6
B503	Seca	irregular	Lobado	plana	blanca con franja translucida	lisa	+	bacilo	+	37	6
B308	Seca	rizoide	Filamentoso	elevada	beige	rugosa	+	bacilo	+	20 - 32	6
B603	Seca	circular	Irregular	elevada	beige con centro más oscuro	lisa	+	bacilo	+	37	6
B309	Seca	circular	Liso	elevada	blanco perlado translucido	lisa	+	coco	-	20	6
B401	Seca	circular	Ondulado	plana	beige claro	lisa	+	bacilo	+	20	6
B305	Seca	circular	Liso	convexa	blanco translucido	lisa	+	coco	-	20	2.6
B306	Seca	circular	Liso	convexa	rosa-roja	lisa	+	coco	-	20	2.6
B307	Seca	circular puntiforme	Liso	convexa	blanca	lisa	+	coco	-	20	2.6
B407	Seca	circular	Liso	elevada	blanco-lechoso	lisa	-	bacilo	-	27	6
B408	Seca	circular	Liso	plana	blanco-lechoso	lisa	-	bacilo	-	27	6

CEPA	EPOCA	FORMA	MARGEN	ELEVACION	COLOR	SUPERFICIE	GRAM	FORMA	ENDOSPORA	TEMPERATURA °C	pH
B301	Lluvia	circular	ondulado	plana	blanco plateado	rugosa	+	bacilo	+	20	6
B302	l lluvia	circular-irregular	liso	plana	beige	lisa	+	coco	-	20	6
B303	l lluvia	circular	liso	convexa	blanca	lisa	+	coco	-	20 -27	2.6
B305	l lluvia	circular	liso	convexa	blanco translucido	lisa	+	coco	-	20	2.6
B310	l lluvia	circular	liso	convexa	blanco perlado	lisa	+	bacilo	+	20	6
B404	l lluvia	circular	liso	elevada	beige-marfil	lisa	-	bacilo	-	27	6
B403	l lluvia	circular-irregular	liso	plana	beige translucido	lisa	-	bacilo	-	27	6
B406	l lluvia	circular	liso	elevada	blanca	lisa	+	coco	-	27	2.6
B503	l lluvia	irregular	lobado	plana	blanca con franja translucida	lisa	+	bacilo	+	32 - 37	6
B504	l lluvia	circular-ovalada	liso	plana	beige translucido	lisa	-	bacilo	-	32	6
B506	l lluvia	circular	liso	plana	blanco lechoso translucido	lisa	-	bacilo	-	32	6
B308	l lluvia	rizoide	filamentoso	elevada	beige	rugosa	+	bacilo	+	32 - 37	6
B507	l lluvia	irregular	ondulado	plana	blanca translucida	lisa	-	bacilo	-	32	6

CEPA	EPOCA	FORMA	MARGEN	ELEVACION	COLOR	SUPERFICIE	GRAM	FORMA	ENDOSPORA	TEMPERATURA °C	pH
B409	Seca	circular	liso	plana	beige con franja beige translucido	lisa	+	bacilo	+	27	6
B501	Seca	circular	ondulado	plana	marfil translucido	lisa	+	bacilo	+	27	6
B502	Seca	circular	liso	convexa	blanca	lisa	+	bacilo	+	27	2.6
B509	Seca	circular-irregular	lobado	plana	blanco metalico	rugosa	+	bacilo	+	32	6
B601	Seca	circular	liso	elevada	beige claro	lisa	-	bacilo	-	32	6
B609	Seca	circular	liso	plana	beige	lisa	-	bacilo	-	37	6
B608	Seca	circular	liso	plana	blanco lechoso	lisa	+	bacilo	+	37	6
B508	Seca	circular-irregular	lobado	plana	blanco translucido metalico	rugosa	+	bacilo	+	32	6

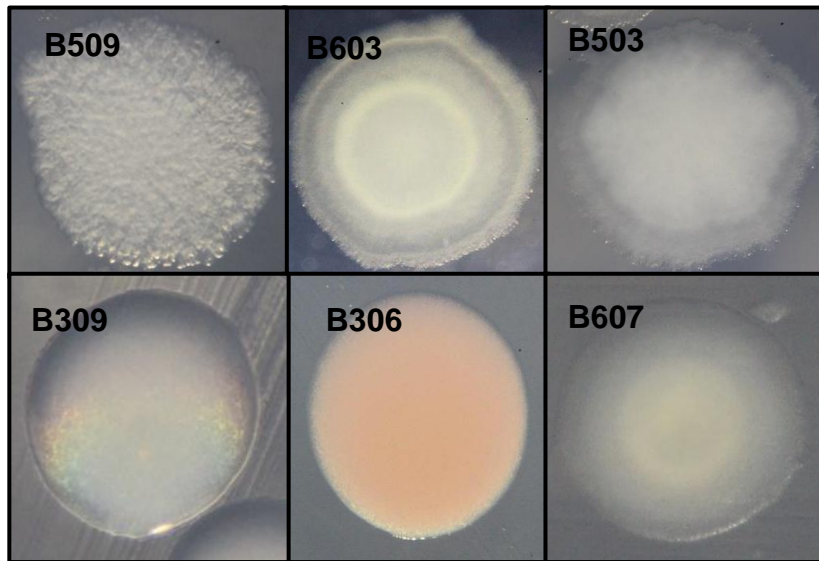


Figura 15. Morfología de diferentes colonias bacterianas de suelo de ZTBP cultivadas en medio Agar Nutritivo. Colonias con bordes irregulares (B509, B603, B503). Colonias con bordes lisos (B309, B306, B607).

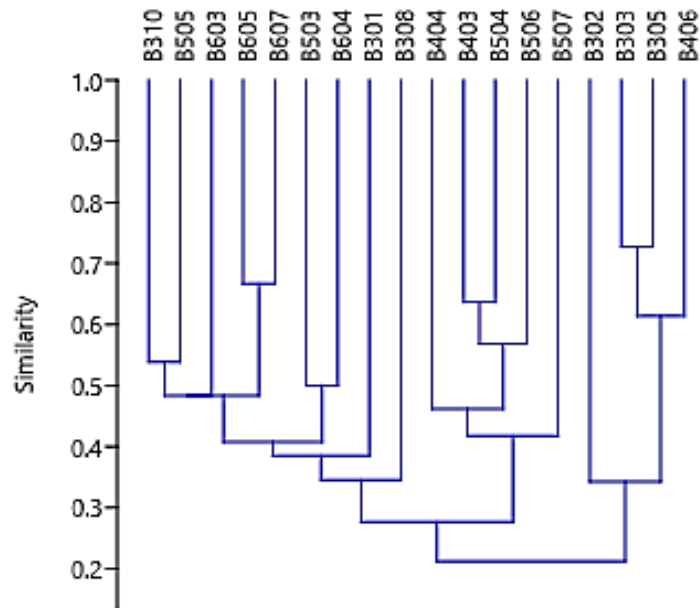


Figura 16. El análisis de clúster muestra la relación entre las características fenotípicas de 18 cepas bacterianas aisladas de suelo de ZTBP en época de lluvia.

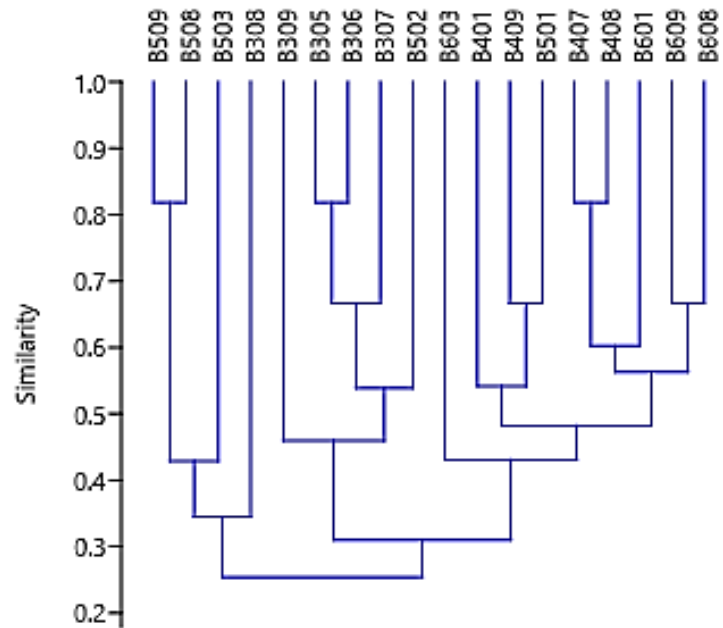


Figura 17. El análisis de clúster muestra la relación entre las características fenotípicas de 18 cepas bacterianas aisladas de suelo de ZTBP en época seca.

8.4.2 Caracterización microscópica

8.4.2.1 Tinción de Gram. En la Tabla 12 se muestra los resultados de la caracterización microscópica para las 36 bacterias aisladas durante las dos épocas de muestreo (lluvia y seca) en suelo de ZTBP. En lo referente a la forma se identificaron dos tipos diferentes de morfologías celulares: bacilos y cocos. La forma de bacilos representó un mayor porcentaje (36%), tanto en la época de lluvia como la época seca, mientras que la forma de cocos representó el 14% en cada una de las épocas (Figura 18). Los bacilos se observaron solos o en pares y en algunas cepas se evidenció la formación de cadenas, los cocos se encontraban solos o agrupados en racimos. (Figura 19).

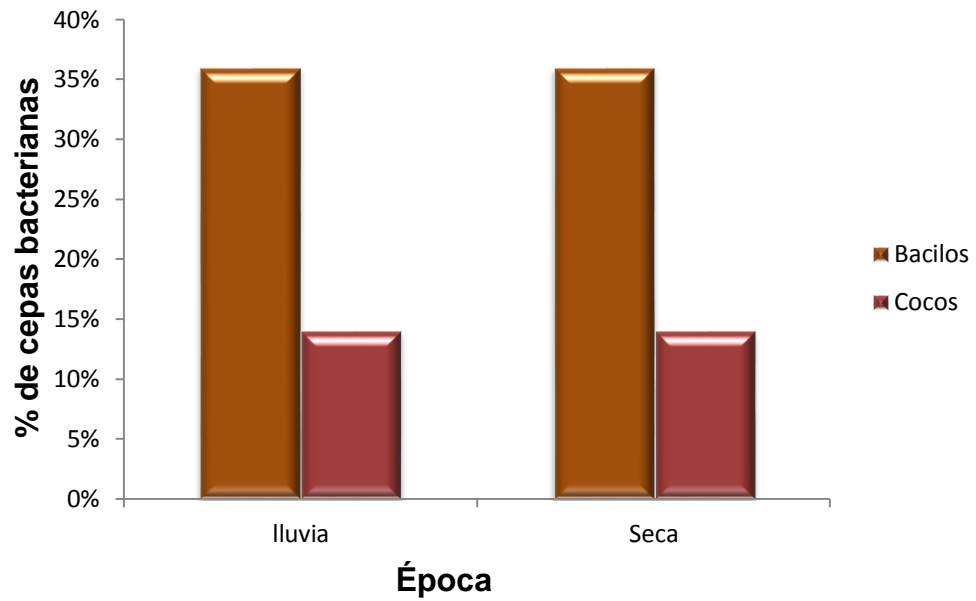


Figura 18. Porcentaje de bacilos y cocos aislados en cada época de muestreo en suelos de ZTBP.

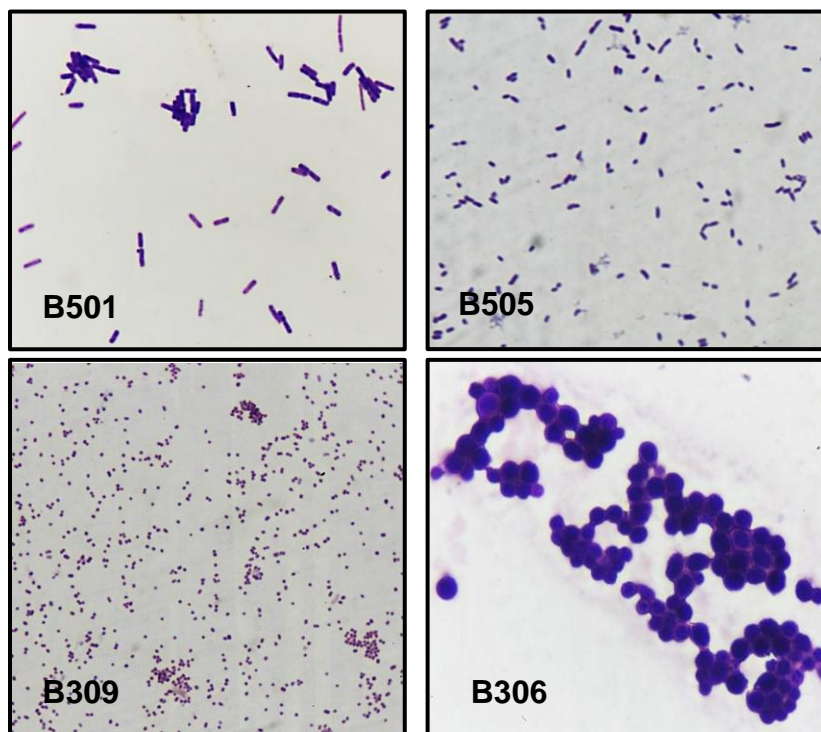


Figura 19. Tinción de Gram de cultivos bacterianos puros luego de 24h de crecimiento en medio Agar Nutritivo sólido, observadas con microscopio óptico a 100X. B501 y B505 bacilos Gram +, B309 y B306 cocos Gram +.

En cuanto al número de bacterias Gram positivas y Gram negativas. La época de lluvia mostro un mayor número de bacterias Gram positivas constituyendo 72,22% de bacterias recuperadas (Figura 20), mientras que en época seca el número de Gram positivas corresponde al 77,78%. (Figura 21). En las dos épocas de muestreo el número de Gram negativas recuperadas fue bajo 27,78% y 22,22% respectivamente. (Figuras 20 y 21).

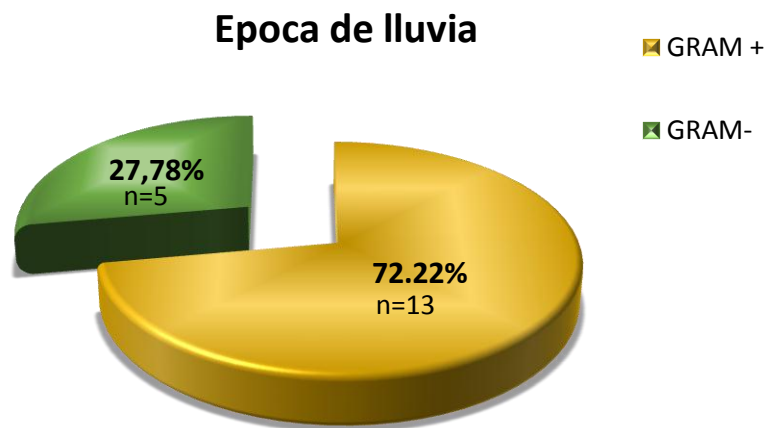


Figura 20. Abundancia porcentual de los grupos Gram + y Gram - en época de lluvia para la muestra de suelo de ZTBP

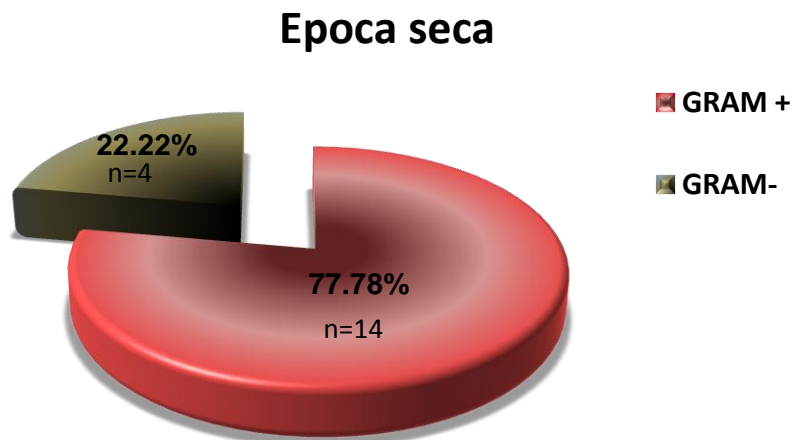


Figura 21. Abundancia porcentual de los grupos Gram + y Gram negativos en época seca para la muestra de suelo de ZTBP.

8.4.2.2 Tinción de esporas. De los 36 aislamientos 19 presentaron formación de esporas. En la Figura 22 se muestran las esporas formadas por cuatro cepas aisladas en este estudio.

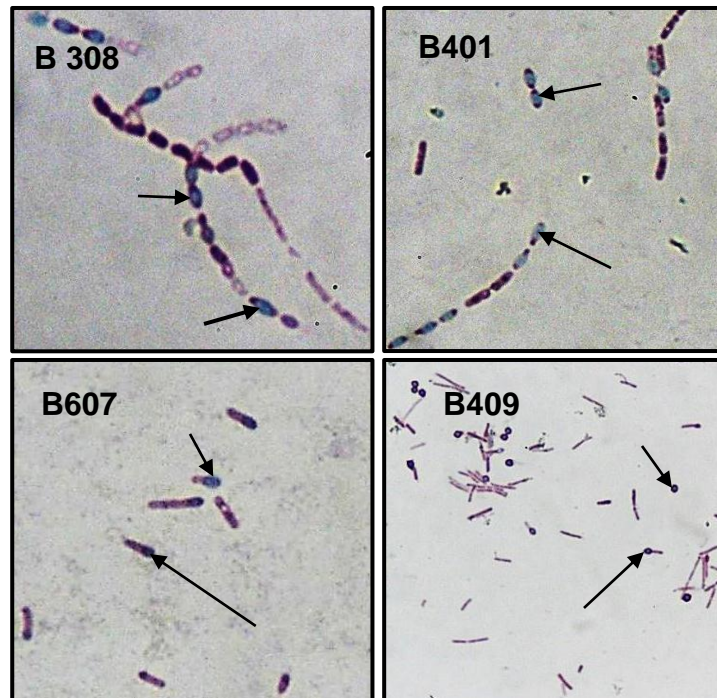


Figura 22. Tinción con verde de malaquita de aislados bacterianos axénicos de muestra de suelo de ZTBP, observada con microscopio óptico a 100x, se observan las endosporas producidas por diferentes cepas luego de 3 días de incubación en medio agar nutritivo. B308 endosporas ovaladas paracentrales, B401 endosporas centrales, B607 endosporas ovaladas terminales, B409 endosporas esféricas terminales, todas son deformantes de la célula.

8.5 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

En esta investigación se aislaron inicialmente 36 cultivos puros, de los cuales, las pruebas bioquímicas se realizaron a 26, de las cuales 12 corresponde a la muestra en época de lluvia y 14 a la muestra en época seca. Los aislados

bacterianos restantes no se identificaron, puesto que luego de dos meses de almacenamiento, no fue posible recuperar células viables de 10 cepas a partir de los stocks por lo que se excluyeron del estudio bioquímico. En la Tabla 13 se muestran las posibles especies identificadas. Taxonómicamente se lograron aislar miembros de los *Phylum* Proteobacterias, Actinobacterias y Firmicutes. A si mismo se encuentran distribuidas en tres clases diferentes (Figura 23): Bacilli (50 y 64%), Gammaproteobacteria (42 y 22%) y Actinobacteria (8 y 14%). De igual forma se identificaron 3 ordenes (Figura 24): Bacillales (50 y 64%), Enterobacteriales (42 y 22%), Actinomycetales (8 y 14%). En época de lluvia se aislaron cepas bacterianas pertenecientes a 5 familias (Figura 25): Bacillaceae (34%), Planococcaceae (8%), Paenibacillaceae (8%), Enterobacteriaceae (42%), Micrococcaceae (8%). Mientras que en época seca se aislaron bacterias pertenecientes a 4 familias (Figura 26): Bacillaceae (57%), Planococcaceae (7%), Enterobacteriaceae (22%), Micrococcaceae (14%). Se identificaron 12 géneros diferentes entre las dos épocas. En época de lluvia los géneros presentes fueron (Figura 27): (*Bacillus* (25%), *Solibacillus* (9%), *Lysinibacillus* (8%), *Paenibacillus* (8%), *Enterobacter* (17%), *Erwinia* (8%), *Pantoea* (17%), *Micrococcus* (8%). En época seca estuvieron presentes los géneros (Figura 28): *Bacillus* (50%), *Virgibacillus* (7%), *Lysinibacillus* (7%), *Citrobacter* (15%), *Escherichia* (7%), *Kocuria* ((7%), *Micrococcus* (7%). Cada época presentó una composición microbiana diferente, solo se encontraron tres especies en común (*Bacillus firmus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*).

El análisis funcional de las cepas identificadas dio lugar a 22 grupos funcionales (GF), de las 23 cepas aisladas en las dos épocas de muestreo, representados por cada rama del dendrograma (Figura 29), y aunque comparten ciertas características funcionales, son diferentes entre sí. Así mismo, se observa que se forma 1 grupo de identidad funcional (GIF), identificado como GIF I con índice de importancia ($P_i=0,09$). El índice de diversidad funcional ($IDF= N^\circ \text{ de GIF}/N^\circ \text{ de}$

cepas evaluadas) fue de 0,9. Este valor representa el número de grupo funcional más importante dentro de los componentes estudiados.

Nivel taxonómico (Clase)

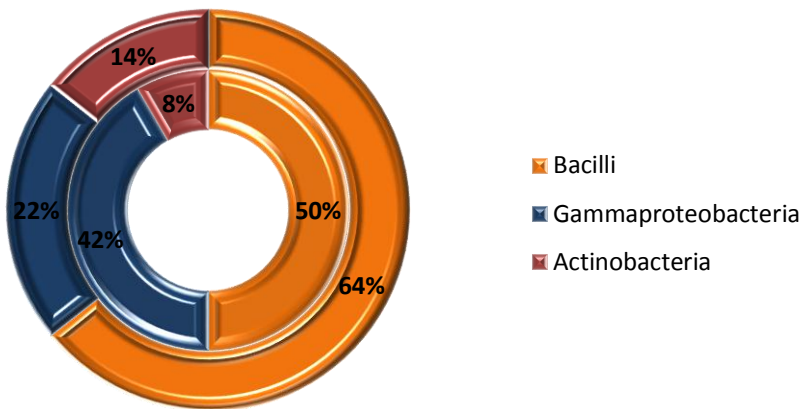


Figura 23. Nivel taxonómico clase. El anillo de datos interior representa los porcentajes para cada clase aislada en época de lluvia y el anillo exterior muestra los porcentajes para cada clase aislada en época seca.

Nivel taxonómico (orden)

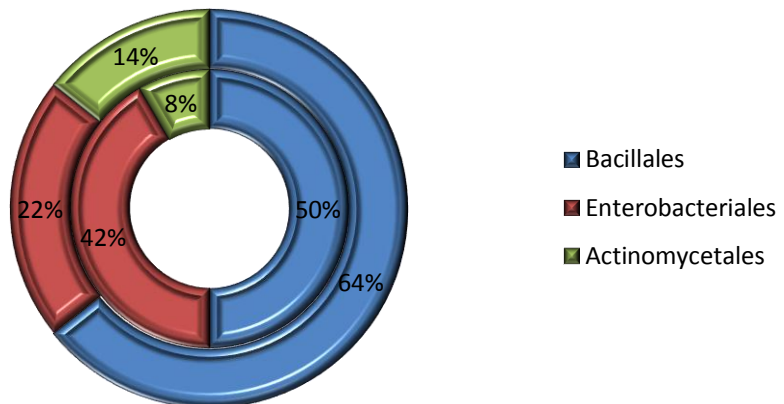


Figura 24. El anillo de datos interior representa los porcentajes para cada orden aislado en época de lluvia y el anillo exterior muestra los porcentajes para cada orden aislado en época seca.

Nivel taxonómico época lluvia
(familia)

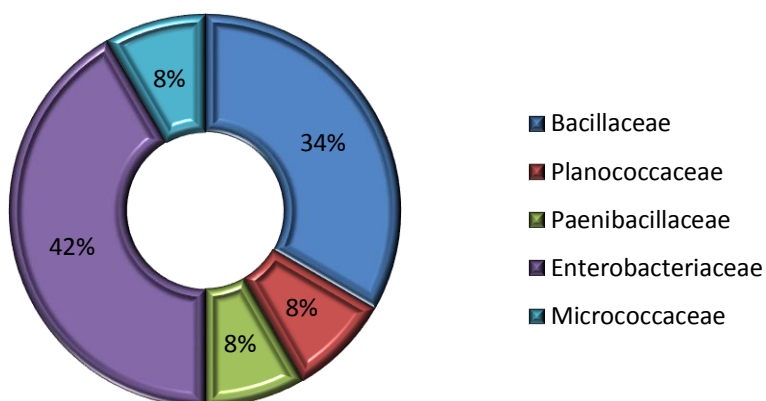


Figura 25. Distribución porcentual de las diferentes familias identificadas en la muestra de suelo de ZTBP en la época de lluvia.

Nivel taxonómico época seca
(familia)

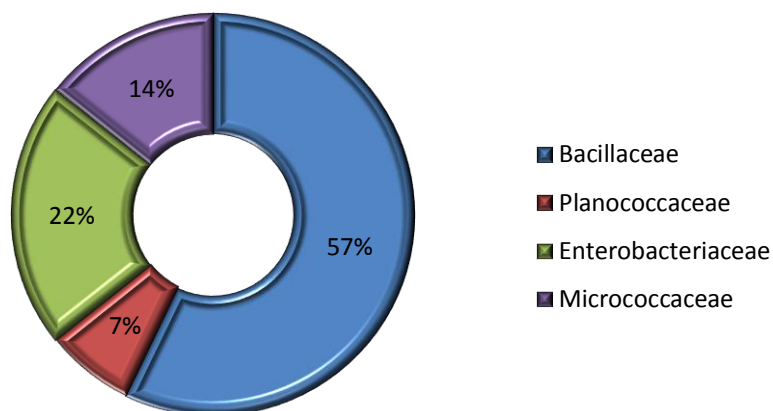


Figura 26. Distribución porcentual de las diferentes familias identificadas en la muestra de suelo de ZTBP en la época seca

Nivel taxonómico época lluvia (género)

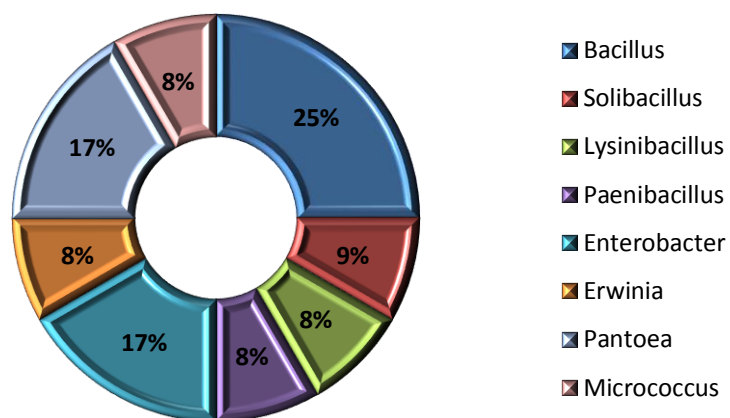


Figura 27. Distribución porcentual de los diferentes géneros identificados en la muestra de suelo de ZTBP en la época de lluvia.

Nivel taxonómico época seca (género)

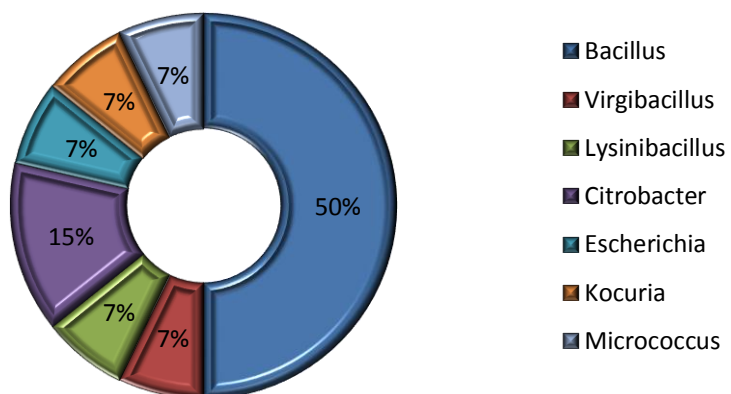


Figura 28. Distribución porcentual de los diferentes géneros identificados en la muestra de suelo de ZTBP en la época seca.

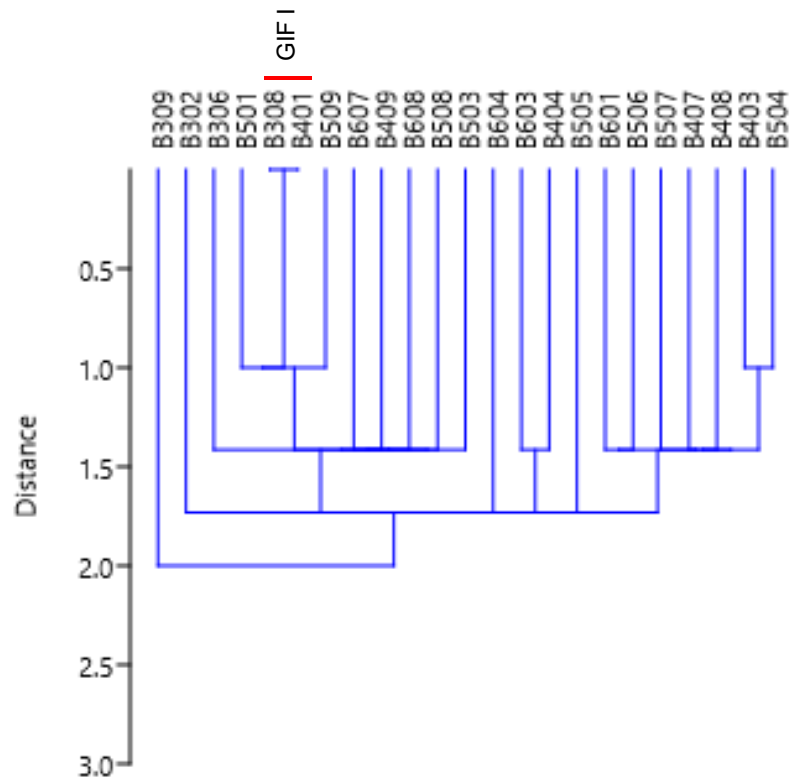


Figura 29. Análisis de clúster de 23 cepas bacterianas aisladas a partir de muestra de suelo de ZTBP en dos épocas (lluvia y seca). Se muestra 21 grupos funcionales (GF) representados por cada rama de dendrograma y la distancia a la cual se separan. Así mismo se observa que se forma un grupo de identidad funcional, identificado como GIF I.

Tabla 13. Morfotipos identificados en las diferentes épocas de muestreo, los cuales indican que la composición de especies es diferente entre las épocas de muestreo.

ÉPOCA DE LLUVIA									
PHYLUM	CLASE	ORDEN	FAMILIA	GENERO	ESPECIE				
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus firmus</i> Werner 1933				
					<i>Bacillus megaterium</i> de Bary 1884				
					<i>Bacillus mycoides</i> Flügge 1886				
				<i>Solibacillus</i>	<i>Solibacillus silvestris</i> (Rheims <i>et al.</i> 1999) Krishnamurthi <i>et al.</i> 2009				
				Planococcaceae		<i>Lysinibacillus</i>	<i>Lysinibacillus shapaericus</i> (Meyer y Neide 1904) Ahmed <i>et al.</i> 2007		
				Paenibacillaceae		<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (Prazmowsky 1880) Ash <i>et al.</i> 1994		
			Proteobacteria	Gammaproteo bacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter amnigenes</i> Izard <i>et al.</i> 1981	
								<i>Enterobacter cloacae</i> (Jordan 1890) Hormaeche y Edwards 1960	
								<i>Erwinia</i>	<i>Erwinia amylovora</i> Burrill 1882
								<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea sp3</i>
		<i>Pantoea stewartii subsp. stewartii</i> (Smith 1898) Mergaert <i>et al.</i> 1993							
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus sp 1</i>				

ÉPOCA SECA					
PHYLUM	CLASE	ORDEN	FAMILIA	GENERO	ESPECIE
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus barbaricus</i> Täubel et al. 2003 <i>Bacillus circulans</i> Jordan 1890 <i>Bacillus coagulans</i> Hammer 1915 <i>Bacillus firmus</i> Werner 1933 <i>Bacillus megaterium</i> de Bary 1884 <i>Bacillus mycoides</i> Flügge 1886 <i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner 1915
			Planococcaceae	<i>Virgibacillus</i>	<i>Virgibacillus pantothenicus</i> (Heyndrickx et al., 1998)
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Lysinibacillus</i> <i>Citrobacter</i>	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> <i>Citrobacter gilleni</i> Brenner et al. 2000 <i>Citrobacter youngae</i> Brenner et al. 1993
				<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i> (Escherich 1885) Castellani y Chalmers 1999
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	<i>Kocuria</i> <i>Micrococcus</i>	<i>Kocuria Rosea</i> <i>Micrococcus sp 2</i>

9. DISCUSIÓN

El presente estudio se orientó al aislamiento e identificación de bacterias cultivable en muestras de suelo en zonas de transición bosque-páramo en el PNNN. Estas zonas son consideradas altamente heterogéneas, con mayor diversidad y altas formas de endemismo, por poseer características de ambos ecosistemas (bosque y páramo), así mismo se caracterizan por tener condiciones microclimáticas fluctuantes (Llambí, 2015; Morales-Betancour y Estévez-Varón, 2006). Estos ecosistemas de alta montaña son considerados ambientes extremos debido a sus altos niveles de radiación solar, baja presión atmosférica, cambios extremos de temperatura y suelos con pH fuertemente ácidos (Avellaneda-Torres *et al.*, 2014), este último concuerda con los resultados obtenidos en el estudio.

El pH es considerado de acuerdo con Jackson (1970) citado en Pereira *et al.*, (2007) como una de las propiedades químicas más importantes del suelo, debido al significativo efecto que ejerce sobre las características físicas, químicas y biológicas. Algunos estudios han determinado que cambios en las comunidades microbianas del suelo está estrechamente relacionadas con las características químicas de suelo (Lauber *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2017) particularmente se ha demostrado que la composición y la diversidad de las bacterias en el suelo esta correlacionado con el pH del suelo (Rousk *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013). Esto corrobora la relación positiva entre la abundancia de UFC/g y el mayor valor de pH (6) evaluado en este estudio. Los análisis demostraron la existencia de diferencia significativa entre los dos valores de pH (2,6 y 6) para todas las condiciones de temperatura del diseño ($p < 0,05$), demostrando que en pH 6 se obtuvo mayor recuperación de células bacterianas. La aparente influencia directa del pH sobre la abundancia de bacterias, probablemente, se deba a los estrechos rangos de pH para un crecimiento óptimo de las bacterias. El pH para el crecimiento óptimo de la mayoría de los microorganismos está cercano a la neutralidad (pH 6.6 a 7.5). Por otra parte como es sabido, la concentración de protones en el suelo está ligada a la concentración de cationes como Al^{+2} , Mn^{+2} , Ca^{+2} y Mo^{+2} , cuando baja el pH se

moviliza el Al^{+2} y Mn^{+2} , que resultan tóxicos para muchas poblaciones microbianas, es quizá por esto que a pH muy bajos como el utilizado en esta investigación (pH= 2.6), la densidad de bacterias se ve afectada (Borda y Largo, 2009).

La temperatura también es uno de los factores que influye sobre la diversidad y estructura de las comunidades bacterianas (Lin *et al.*, 2017). Para cada bacteria existe una temperatura óptima de desarrollo y un rango en el cual este puede ocurrir. La temperatura óptima está siempre más cerca de la máxima que de la mínima. Estas temperaturas son características de cada tipo de organismo, pero no son completamente fijas, pues pueden ser ligeramente modificadas por otros factores del ambiente, en particular por la composición del medio (Madigan *et al.*, 2003). Por tal razón se evaluaron diferentes temperaturas en los tratamientos, con la finalidad de proveer diferentes condiciones, para lograr la mayor recuperación de UFC/g de muestra de suelo, encontrando que hay una influencia significativa sobre la abundancia de bacterias.

Las características macro y micro morfológicas de las colonias son fundamentales en la identificación preliminar y diferenciación de los microorganismos (Olmos *et al.*, 2010) La evaluación de estas características en este estudio permitió determinar que la morfología más frecuente en las dos épocas estudiadas fue de bacilos. Los bacilos o bacterias con forma de bastón, son la forma más numerosa en el suelo y persisten en condiciones ambientales adversas con la formación de endosporas, que funcionan como parte de su ciclo biológico. Además se observó que la mayor cantidad de morfotipos aislados fueron bacterias Gram positivas, lo que indicaría un cambio, de lo que comúnmente se reporta en la literatura, ya que principalmente son bacterias Gram negativas las que son aisladas de muestras de suelo (Avellaneda-Torres y Torres-Rojas, 2013; Palacios, 2012). Es posible que la presencia de un mayor número de Gram positivas se deba a que estas bacterias poseen una pared celular gruesa compuesta por peptidoglicano, lo que permite

que estas células sean más resistentes y rígidas a factores externos (Madigan *et al.*, 2003) lo que puede ser la respuesta para que estas bacterias hayan permanecido en las muestras de suelo. Por otra parte la evaluación fenotípica mostro la existencia de variabilidad morfológica entre los morfotipos aislados, esto demuestra la heterogeneidad morfológica presente en estos suelos.

Al igual que la evaluación fenotípica, la identificación bioquímica de los morfotipos aislados, revelo que la composición de la comunidad bacteriana presento variaciones temporales, las posibles especies identificadas fueron diferentes en las dos épocas, teniendo solamente tres especies en común. Es posible que la heterogeneidad temporal observada se relacionó en parte a los cambios en las condiciones abióticas (temperatura, humedad, disponibilidad de recursos) (Zamora *et al.*, 2012; Lipson, 2007). Se ha reportado que las comunidades cambian a lo largo del tiempo tanto en estructura como en organización (sucesión). Es decir, una comunidad puede convertirse en otra de forma gradual, debido a que son sistemas abiertos con flujos de materia, energía y organismos; por lo que se habla de variabilidad espacio-temporal (Begon *et al.*, 2006). Sin embargo, el análisis funcional revela que entre los diferentes morfotipos obtenidos en las dos épocas de muestreo, existen relaciones funcionales que difieren de una manera moderada en sus requerimientos fisiológicos. Los resultados muestran un alto número de microorganismos con potencial para metabolizar la glucosa seguida de aquellos con capacidad de reducir nitratos en nitritos. Estas equivalencias funcionales permiten inferir la estabilidad funcional de las comunidades microbianas. Esto basado en el hecho de que variaciones ambientales; por ejemplo de orden climático, serán amortiguadas por la aparición de especies funcionales que remplazan las afectadas por dichas variaciones (Lawton y Brown, 1993) en (Zamora *et al.*, 2012). Asimismo, este enfoque del análisis abre la posibilidad de que, independientemente de su clasificación taxonómica, puedan integrarse ensamblajes de microorganismos con interés biotecnológico, siempre y cuando sean funcionalmente compatibles o complementarios.

A nivel taxonómico, fue posible aislar miembros del *Phylum* Proteobacteria, Actinobacteria y Firmicutes en las dos épocas de muestreo. Estudio en suelos de alta montaña utilizando técnicas de secuenciación, reportan que los *Phylum* Acidobacteria, Proteobacteria y Actinobacteria son los más abundantes (Chu *et al.*, 2010; Montaña *et al.*, 2011)., mientras que Lyngwi *et al.*, (2013) reporta que los miembros del *Phylum* Proteobacteria y Firmicutes son los más abundantes en el suelo lo que concuerda con los resultados obtenidos, siendo el *Phylum* Firmicutes el que conto con un mayor número de representantes pertenecientes al género *Bacillus*. Este género es el más abundante en el suelo, sus especies presentan un crecimiento como saprofitas o como simbiontes, comensales o mutualistas, creciendo en interacción con las raíces.

La Abundancia de especies de *Bacillus* se atribuye a su capacidad de adaptación a una amplia gama de condiciones ambientales (Lyngwi *et al.*, 2013). Según Petersohn *et al.*, (2001) en (Calvo y Zúñiga, 2010), este género de bacterias Gram positivas tienen la ventaja de poseer diversos mecanismos para asegurar su supervivencia ante condiciones físicas desfavorables. Investigaciones han reportado que la baja concentración de nutrientes es una de las condiciones que favorecen la esporulación de estas bacterias (Brandes *et al.*, 2011). Se ha demostrado que las endosporas a menudo perduran en ambientes adversos debido a su gran resistencia a la desecación prolongada y a altas temperaturas. La endospora puede persistir en un estado latente mucho tiempo después de la falta de alimentos o agua que ha llevado a la muerte de células vegetativas. Cuando las condiciones ambientales son favorables para la célula vegetativa, la espora germina y emerge un nuevo organismo.

El *Phylum* proteobacteria conto con 8 miembros distribuidos entre los géneros *Enterobacter*, *Pantoea* *Erwinia*, *Citrobacter*, y *Escherichia*, algunos de estos géneros también han sido reportados en suelos de ecosistemas alto andinos como los páramos (Avellaneda-Torres., 2014), la importancia de este phylum radica en

su diversidad metabólica, fisiológica y su relevante intervención en los ciclos del carbono, nitrógeno y azufre (Spain *et al.*, 2009).

El grupo Actinobacterias es uno de los *Phylum* de importancia en la mineralización de la materia orgánica y en la producción de sustancias antimicrobianas (Cruz-Martínez *et al.*, 2009). No obstante, en este estudio se obtuvieron el menor número de miembros correspondientes a los géneros *Micrococcus* (15%) y *Kocuria* (7%). Probablemente debido a que los miembros de esta comunidad adoptan la estrategia K, creciendo lentamente en especial en suelos muy húmedos (50.6%) como los presentados en el sitio de estudio.

Es necesario tener en cuenta que el aislamiento e identificación de microbiota en suelos alto andinos como el Parque Natural Nacional Los Nevados, se han realizado mediante la combinación de técnicas dependientes y no dependientes de cultivos (Avellaneda, 2014). Sin embargo en este estudio se utilizaron solamente técnicas dependientes de cultivo y los resultados de identificación obtenidos en el estudio concuerdan con los reportados para estos ecosistemas mediante las técnicas de secuenciación, por lo tanto estos estudios validan que los análisis dependientes de cultivo pueden dar aproximaciones sobre la vida microbiana en estos ambientes, no obstante este aspecto necesita mayor investigación. Los resultados obtenidos son un aporte al conocimiento de la microbiota de los suelos de zonas de transición bosque-páramo mostrando la distribución heterogénea de grupos microbianos dentro de este ecosistema. Además, este estudio también respalda la literatura existente, la cual muestra que las propiedades fisicoquímicas como la temperatura y el pH, así como la temporalidad afectan directamente la abundancia de las comunidades microbianas. Además este estudio revalida la importancia de las ZTBP como fuentes de recursos genéticos y capacidades químicas y metabólicas, al igual que ratificar la importancia de los microorganismos en los diferentes procesos que se llevan a cabo en el suelo, como los ciclos biogeoquímicos.

10. CONCLUSIONES

- Las bacterias cultivables de zonas de transición bosque-páramo presentan variabilidad en las características morfológicas, predominando las formas circulares, con bordes lisos y planas.
- Las características microscópicas muestran predominancia de bacterias Gram positivas en forma bacilar.
- Las variables fisicoquímicas como la temperatura y el pH causan variabilidad en la abundancia de UFC/g de suelo.
- La abundancia de UFC/g en la época de lluvia se ve favorecida por el pH 6 y temperaturas bajas (20°C); mientras que en época seca la temperatura 37°C es más favorable para las UFC.
- La composición bacteriana presente en suelos en transición bosque-páramo, se vio afectada por la temporalidad (época seca y lluviosa), mostrando diferencia entre las especies encontradas en cada época.
- A nivel taxonómico se encontraron representantes de los *Phylum* Proteobacteria, Actinobacteria y Firmicutes.
- Los Firmicutes fue el *Phylum* más representativo, predominando especies del genero *Bacillus*.
- A nivel funcional los morfotipos obtenidos en las dos épocas de muestreo, presentaron relaciones funcionales, que difieren de una manera cuantitativamente moderada en sus requerimientos fisiológicos.
- La mayoría de los morfotipos aislados tiene la capacidad de fermentar glucosa y reducir nitratos en nitritos.

11. RECOMENDACIONES

- Se recomienda ampliar el estudio hacia otros grupos microbianos como los hongos, los cuales también cumplen papeles importantes dentro del ecosistema suelo.
- Evaluar los parámetros fisicoquímicos del suelo con el fin de obtener una mayor comprensión sobre las funciones microbianas en estos ecosistemas.
- Se sugiere profundizar en estudios que evalúen el impacto de la condición climática y la altura sobre las comunidades microbianas de los suelos de zonas de transición bosque-páramo.
- Introducir en trabajos futuros el empleo de técnicas moleculares que permitan la Identificación de las bacterianas tanto cultivables como no cultivables presentes en estos ecosistemas, lo que ampliaría el conocimiento de la diversidad bacteriana en las ZTBP.
- Realizar estudios posteriores sobre la identificación molecular de las posibles especies obtenidas, para así establecer con mayor certeza la ubicación taxonómica de las bacterias aisladas en la presente investigación.
- Evaluar la capacidad fisiológica y metabólica de las especies aisladas en este estudio, en relación a sus principales funciones del suelo y los ciclos biogeoquímicos.
- Continuar con la exploración de los mecanismos bióticos y abióticos que contribuyen con la variación de las comunidades microbianas de ZTBP.

12. BIBLIOGRAFIA

- Andrade C, M. G. (2011). Estado del conocimiento de la biodiversidad en Colombia y sus amenazas. Consideraciones para fortalecer la interacción ciencia-política. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas Y Naturales*, 35(137), 491–508.
- Avellaneda-Torres, L. M., Torres, E., y León-Sicard, T. E. (2014). Agricultura y vida en el páramo: Una mirada desde la vereda El Bosque (Parque Nacional Natural De Los Nevados). *Cuadernos de Desarrollo Rural*, 11(73), 105–128.
- Avellaneda-Torres, L. M., y Torres, E. (2013). *Biodiversidad de grupos funcionales de microorganismos asociados a suelos bajo cultivo de papa, ganadería y páramo en el Parque Nacional Natural de Los Nevados, Colombia*. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Benavides, G., y Hermida, A. M. (2008). Aislamiento e identificación de flora bacteriana nativa del suelo de los páramos Cruz Verde y Guasca (Cundinamarca). Pontificia Universidad Javeriana.
- Begon, M., Harper, J. L., & Townsend, C. R. (2006). *Ecology: Individuals, Populations and Communities*. Blackwell science (Vol. 3rd Editio).
- Bernal, E., Celis, S., Galíndez, X., Moratto, C., Sánchez, J., & García, D. (2006). Microflora Cultivable y Endomicorizas Obtenidas en Hojarasca de Bósque (Páramo Guerrero - Finca Puente de Tierra) Zipaquirá, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 11(2), 1–6.
- Borda, N. J., y Largo Y. M. (2009). Comparación de la densidad de bacterias desnitrificantes entre bosque inundado y Morichal en la reserva natural Bojonawi. Pontificia Universidad Javeriana.
- Brandes, A. A., Kölle, L., & Brandl, H. (2011). Detection of bacterial endospores in soil by terbium fluorescence. *International Journal of Microbiology*, 2011, 10–15.
- Breed, R. S., Murray, E. G. D., & Smith, N. R. (1957). *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. Igarss 2014 (7th ed.). Baltimore, the williams & wilkins company.
- Breed, R., Murray, E., & Parker, A. (1948). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (6th ed.). Baltimore, the williams & wilkins company.

- Buytaert, W., Deckers, J., & Wyseure, G. (2005). Description and classification of nonallophanic Andosols in south Ecuadorian alpine grasslands (pa. *Geomorphology*, 2, 15. Casablanca, E., Ríos, N., Terraza, E., & Álvarez, M. (2011). β -glucoside production by thermophilic bacteria indigenous the bolivian altiplano culture.
- Calvo, P., & Zúñiga, D. (2010). PHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF *Bacillus* spp. STRAINS FROM POTATO (*Solanum tuberosum*) RHIZOSPHERE. *Ecología Aplicada*, 9(1).
- Casablanca, E., Ríos, N., Terraza, E., & Álvarez, M. (2011). *β -glucoside production by thermophilic bacteria indigenous the bolivian altiplano culture*. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia.
- Castaño, C. (ed.). 2002. Páramos y ecosistemas alto andinos de Colombia en condición hotspot & global climatic tensor. Bogotá: Ministerio del Medio Ambiente e Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. pp. 387
- Cavicchioli, R., Siddiqui, K. S., Andrews, D., & Sowers, K. R. (2002). Low-temperature extremophiles and their applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 253–261.
- Congreso mundial de páramos, memorias tomo II, mayo de 2002. (2002).
- Constantinos, E. V. y and Antranikian, G. 2004. Extremophiles: pH, temperatura, and salinity, 146-152p. In Ass Press(ed), Microbial diversity and bioprospecting. Washington. D.C.
- Cruz-Martínez, K., Suttle, K. B., Brodie, E. L., Power, M. E., Andersen, G. L., & Banfield, J. F. (2009). Despite strong seasonal responses, soil microbial consortia are more resilient to long-term changes in rainfall than overlying grassland. *ISME Journal*, 3(6).
- Chu, H., Fierer, N., Lauber, C. L., Caporaso, J. G., Knight, R. and Grogan, P. (2010), Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. *Environmental Microbiology*, 12: 2998–3006.
- De Los Ríos C, J. C., y Almeida, J. (2010). Percepciones y formas de adaptación a riesgos sociambientales en el páramo de Sonsón, Colombia. *Cuadernos de Desarrollo Rural*, 7(65), 107–124.
- Dion, P., y Nautiyal, C. (2008). *Microbiology of Extreme Soils* (Vol. 13). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- Doetsch N (1981) Determinative methods of light microscopy. En: Manual of Methods for General Microbiology. Gerhardt P (ed), American Society of Microbiology, Washington, pp 21-33
- FAO. (2002). Estado de la información forestal en Colombia. “*Información Y Análisis Para El Manejo Forestal Sostenible: Integrando Esfuerzos Nacionales E Internacionales En 13 Países Tropicales En América Latina,*” 1–248.
- Franco, L. M. (2010). *Evaluación de la actividad lipolítica de microorganismos aislados de suelos del Parque Natural Nacional (PNN) Los Nevados.* Pontificia Universidad Javeriana
- Flórez, G., Alzate, A., & Rincón, A. (2014). Participación comunitaria para la construcción de humedales altoandinos. Experiencia piloto en el sector el ocho y páramo de letras. *Luna Azul*, (34), 240–256.
- Gavilánez, T. C. (2013). Determinación de la Biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para uso potencial en biorremediación. Universidad Técnica de Ambato.
- Greenpeace. (2013). Paramos en peligro. El caso de la minería de Carbon en Pisba.
- Gutiérrez, M. E., P. A. Zapata y D. Ruíz, 2006. Entendimiento de las señales de cambio climático y variabilidad climática en la oferta hídrica superficial de cuencas hidrográficas en zonas de alta montaña. Envigado, Antioquia: Environmental Engineering Program, Antioquia School of Engineering. 160 pp.
- Herzog, S. K., Jørgensen, P. M., Martinez, R., & Tiessen, H. (2012). *Cambio Climático y Biodiversidad en los Andes Tropicales.* (S. K. Herzog, R. Martinez, P. M. Jorgensen, & H. Tiessen, Eds.).
- Huang, Q., Tran, K. N., Rodgers, J. M., Bartlett, D. H., Hemley, R. J., & Ichiye, T. (2016). A molecular perspective on the limits of life : Enzymes under pressure. *Condensed Matter Physics*, 19(2), 1–16.
- Lauber, C. L., Strickland, M. S., Bradford, M. A., & Fierer, N. (2008). The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(9), 2407–2415.
- Lin, Y.-T., Jia, Z., Wang, D., & Chiu, C.-Y. (2017). Effects of temperature on the composition and diversity of bacterial communities in bamboo soils at different elevations. *Biogeosciences*, 14(21), 4879–4889.

- Lipson, D. A. (2007). Relationships between temperature responses and bacterial community structure along seasonal and altitudinal gradients. *FEMS Microbiology Ecology*, 59(2), 418–427.
- Lizarazo-Medina, P. X., & Gómez-Vasquez, D. (2014). Rizospheric Microbiota of Espeletia spp. from Santa Inés and Frontino-Urrao Paramos in Antioquia, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 20(1), 175–182.
- Llambí, L. D. (2015). Vegetation Structure , Diversity and Dynamics in the Forest-Paramo Ecotone : A Review of the Evidence in the Cordillera de Mérida. *Acta Biologica Colombiana*, 20(3), 5–19.
- Lyngwi, N. A., Koijam, K., Sharma, D., & Joshi, S. R. (2013). Cultivable bacterial diversity along the altitudinal zonation and vegetation range of tropical Eastern Himalaya. *Revista de Biología Tropical*, 61(1), 467–490.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). *Biología de los Microorganismos*. (P. EDUCACION, Ed.) (10th ed.).
- MacFaddin, Jean. (2004). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia Clínica*. (3ra ed.). Buenos Aires: Panamericana.
- Márquez Torres, F. J. (2007). Aislamiento Y Taxonomía De Bacterias Del Género Bacillus Recolectadas En Suelos De Un Bosque De Pinus Radiata Y Una Pradera Permanente En Distintas Épocas De Muestreo. *Licenciatura*, 1–66.
- Ministerio del Medio Ambiente. (2002). Programa nacional para el manejo sostenible y restauración de ecosistemas de alta montaña colombiana: páramos. *Congreso Mundial de Páramos- Memorias Tomo I*, 73.
- Mirete, S., Morgante, V., González, J. (2016). Functional metagenomics of extreme environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 38, 143–149.
- Montaña, J. S., Jiménez, D. J., Hernández, M., Ángel, T., & Baena, S. (2011). Taxonomic and functional assignment of cloned sequences from high Andean forest soil metagenome . *Antonie Van Leeuwenhoek*.
- Montenegro, A. L., y Ríos, O. V. (2008). Caracterización de bordes de bosque altoandino e implicaciones para la restauración ecológica en la Reserva Forestal de Cogua (Colombia). *Revista de Biología Tropical*, 56(3), 1543–1556.
- Morales-Betancourt, J. A., & Estévez-Varón, J. V. (2006). EL PÁRAMO : ¿ECOSISTEMA EN VÍA DE EXTINCIÓN ? *Luna Azul*, núm. 22., 39–51.

- Moratto, C., Martínez, L. J., Valencia, H., & Sánchez, J. (2005). Efecto del uso del suelo sobre hongos solubilizadores de fosfato y bacterias diazotróficas en el páramo de Guerrero (Cundinamarca). *Agronomía Colombiana*, 23(2), 11.
- Olmos, A. F., Fuente, C. G. de la, Nieto, J. A. S., & Ramos, S. V. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. In E. Cercenado & Rafael Cantón (Eds.), *Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
- Palacios, P. A. (2012). *Diversidad de bacterias con actividad lipolítica en un cultivo enriquecido de suelo de páramo y glaciar del Parque Nacional Natural los Nevados*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Parques Nacionales Naturales de Colombia. (2012). Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible.
- Pereira, C. G., Herrera, S. J., Machuca, H. A., & Sánchez, O. M. (2007). Efecto del pH sobre el crecimiento in vitro de hongos ectomicorrícicos recolectados de plantaciones de *Pinus radiata*. *Bosque (Valdivia)*, 28(3), 215–219.
- Pérez-reytor, D. C., Estela, A., y Espinosa, S. (2010). Evaluación de la tolerancia a la crioconservación de dos cepas de *Escherichia coli* K12 de uso frecuente en biotecnología *Materiales y Métodos*, (2), 11–17.
- Ramírez, Ninfa; Serrano, Jose Antonio; Sandoval, H. (2006). Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(3), 56–71.
- Rothschild, L. J., & Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature*, 409, 1092–1101.
- Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P. C., Lauber, C. L., Lozupone, C., Caporaso, J. G., ... Fierer, N. (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME Journal*, 4(10), 1340–1351.
- Rubiano, C. (2006). Aislamiento y Caracterización de microorganismos termófilos anaerobios lipolíticos, proteolíticos y amilolíticos de manantiales termominerales de Paipa e Iza (Boyacá). Pontificia Universidad Javeriana.
- Ruiz, D., Moreno, H. A., Gutiérrez, M. E., & Zapata, P. A. (2008). Changing Climate and Endangered High Mountain Ecosystems in Colombia. *Science of the Total Environment*, 398. 122-132.

- Sanz, S. A. (2011). Prácticas de microbiología. Universidad de la Rioja.
- Sarmiento, C., y León, O. A. (Eds.). (2015). *TRANSICIÓN BOSQUE-PÁRAMO* Bases conceptuales y métodos para su identificación en los Andes colombianos (1st ed.). Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Solanki, A., y Gupta, D. (2013). Studies on Adaptations of Thermophilic Bacteria at. *Research Journal of Chemical and Environmental Sciences*, 1(2), 29–31.
- Spain, A. M., Krumholz, L. R., y Elshahed, M. S. (2009). Abundance, composition, diversity and novelty of soil Proteobacteria. *ISME Journal*, 3(8), 992–1000.
- Suárez, A. Y. (2010). Análisis de la funcionalidad y diversidad microbiana en suelos dedicados al cultivo de papa criolla (*Solanum Phureja*) mediante una aproximación metagenómica. Universidad Nacional de Colombia.
- Tian, Q., Taniguchi, T., Shi, W.-Y., Li, G., Yamanaka, N., & Du, S. (2017). Land-use types and soil chemical properties influence soil microbial communities in the semiarid Loess Plateau region in China. *Scientific Reports*, 7(February), 45289.
- Torsvik, V., y Lise, O. (2008). Microbial Diversity, Life Strategies, and Adaptation to Life in Extreme Soil. *ResearchGate*, 13(January 2008).
- Tovar, A. (2011). Efecto de la modificación de la temperatura del suelo sobre la densidad y riqueza de grupos funcionales de nematodos en bosque altoandino (Cuenca río Blanco, Cundinamarca). Pontificia Universidad Javeriana.
- Van den Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 213–218.
- Van Wyngaarden W, Fandiño M (2002) Parque Nacional “Los Nevados”. Un caso de selección y zonificación de áreas de conservación biológica. En serie: Investigación 4. Javegraf (eds.) Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia
- Zamora, A., Malaver, N., & Ramos, J. (2012). Análisis Funcional De Microorganismos: Un Estimador De Diversidad Y Estructura Comunitaria. *Acta Biol. Venez.*, 32(1), 57–86.

Zhang, B., Liang, C., He, H., & Zhang, X. (2013). Variations in Soil Microbial Communities and Residues Along an Altitude Gradient on the Northern Slope of Changbai Mountain, China. *PLoS ONE*, 8(6).