



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIÓLOGO

Caracterización de microorganismos resistentes a bajas temperaturas y obtención de sustancias poliméricas extracelulares como un mecanismo protector a las heladas en cultivos andinos

ARTÍCULO ACADÉMICO

AUTORA: Cartuche Zaruma, Krupskaya Ivannova.

DIRECTOR: Sánchez Rodríguez, Aminael, Ph.D.

CO-DIRECTORA: Aguirre Chamba, Paulina Isabel, Ing.

LOJA - ECUADOR

2018



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2018

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Doctor.

Aminael Sánchez Rodríguez.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: “Caracterización de microorganismos resistentes a bajas temperaturas y obtención de sustancias poliméricas extracelulares como un mecanismo protector a las heladas en cultivos andinos”, realizado por Krupskaya Ivannova Cartuche Zaruma ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, noviembre de 2018

f)

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Krupskaya Ivannova Cartuche Zaruma, declaro ser autora del presente trabajo de titulación: **“Caracterización de microorganismos resistentes a bajas temperaturas y obtención de sustancias poliméricas extracelulares como un mecanismo protector a las heladas en cultivos andinos”**, de la Titulación de Biología, siendo Aminael Sánchez Rodríguez director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

Expreso tener pleno conocimiento de la obligación que tienen las IES, de conformidad con el Artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor. Así mismo autorizo a la SENESCYT a tener una copia del referido trabajo de titulación, con el propósito de generar un repositorio que democratice la información, respetando las políticas de propiedad intelectual vigentes.

f)

Autora: Krupskaya Ivannova Cartuche Zaruma

Cédula: 1104609639

DEDICATORIA

A mi mamá, Nancy, por su infinito amor a lo largo de toda mi vida, por ser la persona más sincera e importante, por apoyarme en cada paso que he dado, por ayudarme a ser quien soy. Por enseñarme a ser independiente y por siempre cuidar de mí.

A mi abuelito Jorge, quien a pesar de haber sido parte de mi vida por menos tiempo del que me hubiera gustado, me enseñó a trabajar duro, a no rendirme y a seguir mis metas.

A mi familia por su apoyo.

Krupskaya

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Aminael Sánchez por permitirme ser parte de este proyecto, por todo lo que he aprendido de él, por su apoyo y guía durante la realización de este trabajo.

A la Ing. Paulina Aguirre por su constante ayuda y motivación para avanzar con este trabajo de titulación. Agradezco profundamente su apoyo y tiempo brindado para solucionar cada problema.

Al Dr. Darío Cruz por su ayuda con cualquier pregunta o favor y por compartir sus conocimientos para realizar efectivamente la parte molecular de este trabajo.

Al Bq. Oscar Vivanco, por su colaboración y ayuda en el laboratorio.

A mi tribunal de tesis, Dr. Paulo Herrera y Dr. Paúl Loján, por sus comentarios y por estar prestos a brindarme su ayuda cuando la solicité.

A mis compañeras y compañeros de laboratorio, con quienes compartí muchos momentos y de quienes aprendí mucho también.

A todos mis profesores y profesoras, quienes a través de sus enseñanzas me han permitido adquirir aptitudes para desenvolverme como Bióloga.

A mi madre y familia por su apoyo incondicional.

A Henry por estar a mi lado en momentos difíciles y animarme a ser mejor cada vez. A mis amigas y amigos por ser parte de mi vida.

Krupskaya

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS	VI
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. MATERIALES Y MÉTODOS	6
2.1 Área de estudio	6
2.1.1 Recolección de muestras	6
2.2 Enriquecimiento y aislamiento de microorganismos	6
2.3 Caracterización morfológica de microorganismos aislados	7
2.4 Caracterización molecular de microorganismos aislados	7
2.4.1 Extracción de ADN.....	7
2.4.2 Reacción en cadena de polimerasa (PCR)	7
2.4.3 Análisis de secuencias	8
2.5 Caracterización de la psicotolerancia de los microorganismos aislados.....	9
2.5.1 Cinética de crecimiento de microorganismos aislados	9
2.5.2 Diseño experimental para evaluar la psicotolerancia en los aislados	10
2.5.3 Análisis estadístico	11
3. RESULTADOS	11
3.1 Enriquecimiento y aislamiento de microorganismos	11
3.2 Caracterización morfológica de microorganismos aislados	11
3.3 Caracterización molecular y filogenia	13
3.4 Cinética de crecimiento de microorganismos aislados	14
3.5 Evaluación de características psicotolerantes	15
4. DISCUSIÓN.....	18
4.1 Aislamiento, caracterización morfológica y molecular de microorganismos	18
4.2 Cinética de crecimiento de microorganismos aislados	19
4.3 Características psicotolerantes de microorganismos aislados	19
CONCLUSIONES.....	22

BIBLIOGRAFÍA.....	23
ANEXOS.....	29

RESUMEN

Los organismos psicrotolerantes tienen una temperatura de crecimiento que va desde 0 °C a 30 °C. Para poder sobrevivir en condiciones extremas, estos microorganismos han desarrollado estrategias tales como la producción de crioprotectores como sustancias poliméricas extracelulares (EPS). En la presente investigación se aislaron 10 microorganismos de la rizósfera del cerro Fierro Urco, ubicado en la provincia de Loja. Los aislados fueron caracterizados morfológica y molecularmente y se evaluó su resistencia a tres temperaturas. Se distinguió cuatro morfotipos a partir de los datos morfológicos recolectados. A través del análisis de la región 16S rRNA se identificaron tres géneros de bacterias: *Janthinobacterium*, *Pseudomonas* y *Rahnella*. Se observó diferencias significativas en el número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) en las temperaturas de 4 °C, 27 °C y 37 °C. El mayor número de UFC se obtuvo en 27 °C para todas las cepas a excepción del aislado M1. De igual manera, el apareamiento de colonias se observó en menos días a esta temperatura. Como conclusión general, se expresa que se consiguió aislar y caracterizar microorganismos psicrotolerantes.

Palabras clave: aislamiento, bacterias psicrotolerantes, morfología, caracterización molecular

ABSTRACT

Psychrotolerant organisms present a growth temperature range from 0°C to 30°C. In order to survive in extreme conditions, these microorganisms have developed strategies like the production of cryoprotectants such as extracellular polymeric substances (EPS). In the present investigation, 10 microorganisms were isolated from the rhizosphere of Fierro Urco, located in the province of Loja. The isolates were characterized morphologically and molecularly and their resistance to three temperatures was also evaluated. Based on the morphological data collected, four morphotypes were observed. Through the analysis of the 16S rRNA region, three genera of bacteria were identified: *Janthinobacterium*, *Pseudomonas* and *Rahnella*. Significant differences in the number of colony forming units (CFU/mL) at temperatures of 4 °C, 27 °C and 37 °C were observed. The highest number of CFU was obtained at 27 °C for all strains except for the strain M1. Similarly, the appearance of the colonies was observed in less days at this temperature. As a general conclusion, it is expressed that it was possible to isolate and characterize psychrotolerant microorganisms.

Key words: isolation, psychrotolerant bacteria, morphology, molecular characterization

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo a su temperatura de crecimiento, los microorganismos pueden ser clasificados en psicrófilos, psicrótrofos, mesófilos, termófilos e hipertermófilos (Madigan, Clark, & Bender, 2009). Los microorganismos psicrófilos son capaces de desarrollarse a temperaturas bajo 0 °C, tienen una temperatura óptima de crecimiento alrededor de 15 °C o menos y una temperatura máxima de crecimiento de 20 °C. Generalmente se encuentran en hábitats permanentemente fríos como regiones polares (Margesin, Neuner, & Storey, 2007). Por otro lado, los psicrótrofos o psicrotolerantes se desarrollan en temperaturas menos extremas y habitan en ambientes con fluctuaciones de temperatura diaria o estacional. Poseen la habilidad de crecer desde 0 °C, pero sus temperaturas de crecimiento óptimas están situadas entre 20 y 30 °C (Moyer & Morita, 2007; Maczulak, 2011; Yumoto, 2013).

Para ser capaces de sobrevivir y estar activos a extremas condiciones de frío, los microorganismos psicrótrofos o psicrotolerantes han desarrollado varias estrategias. Algunas de ellas involucran cambios en sus rutas metabólicas y cambios fisiológicos que promueven la producción de diferentes moléculas crioprotectoras y proteínas de aclimatación en frío. Además, presentan cambios estructurales asociados a la membrana celular y citoplasma (Margesin & Miteva, 2011; Subramanian et al., 2011). Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) son un crioprotectante importante (Krems & Deming, 2008) y se definen como materiales orgánicos complejos compuestos por polisacáridos que juegan un papel fundamental en la ecología microbiana y en la adaptación de los microorganismos a su ambiente porque les permite defenderse contra las presiones ambientales (Carpenter, Marx, & Deming, 2009).

Las características que poseen los microorganismos psicrotolerantes y que se mencionaron anteriormente, pueden ser aprovechadas para enfrentar uno de los problemas más complejos de la actualidad como es el cambio climático. Se estima que este fenómeno ocasionará escasez de agua lo que degradará la calidad de los suelos afectando directamente a la práctica agrícola. De igual manera, el cambio de la temperatura y precipitaciones reduce y altera las zonas apropiadas para sembrar cultivos (Kurukulasuriya & Rosenthal, 2003). Otro impacto generado por el cambio climático es el aumento en la frecuencia de heladas, las cuales representan un severo problema porque destruyen las especies vegetales (Anwar, Li Liu, Macadam, & Kelly, 2013).

Las heladas se definen como el descenso de la temperatura del aire por debajo de 0 °C, lo que lleva a una etapa de congelación (Oliver, 2008). Las heladas son uno de los factores limitantes para la producción agrícola en los Andes debido a que las temperaturas bajo cero

congelan el agua de las células vegetales, causando deshidratación y daño a la pared celular (Sakai & Larcher, 2012). Se han descrito dos tipos de heladas: por advección o blanca y helada por radiación, también conocida como helada negra. De estas dos clases, la última es la más común y perjudicial para los cultivos y se ha observado que su frecuencia y severidad han aumentado; razón por la cual se han establecido acciones para combatirlas (Perez et al., 2010).

Se conocen varios métodos tradicionales de protección contra las heladas que pueden clasificarse en dos clases: protección pasiva y protección activa. La protección pasiva debe ser planeada e implementada con anterioridad debido a que incluye estrategias que están enfocadas a evitar el daño causado por las heladas, en lugar de proteger a los cultivos de su ocurrencia. Algunas de estas estrategias son selección del emplazamiento, nutrición adecuada de plantas, selección de variedades resistentes e implementación de barreras como árboles o arbustos (Van der Gulik, 1988). Por otra parte, los métodos de protección activa mitigan los efectos causados por este fenómeno. Entre estas técnicas se encuentran el uso de estufas, aspersores, ventiladores y riego de superficie (Snyder & de Melo-Abrey, 2005). No obstante, en algunos casos estos sistemas no son efectivos.

A pesar de los beneficios y posibles soluciones que estas técnicas ofrecen, presentan algunas limitaciones. Requieren el uso de energía, la cual no siempre es accesible debido a que las prácticas agrícolas se realizan en lugares alejados. Su instalación y aplicación es más costosa y algunas de estas tecnologías no se encuentran disponibles en todos los países. Por ejemplo, el uso de estufas generalmente está restringido a países desarrollados y en cultivos de alto valor (Snyder & de Melo-Abrey, 2005). Por consiguiente, el desarrollo de alternativas biotecnológicas de bajo costo que permitan superar estas barreras es necesario.

Una opción potencial para reducir los efectos de las heladas es el uso de crioprotectantes, los cuales representan una barrera física que evita la formación de cristales de hielo dentro de la hoja y por lo tanto impide el daño por congelación (Centinari, Smith, & Londo, 2016). Permiten aumentar la tolerancia a las heladas, lo cual ha sido confirmado por algunos estudios. Francko, Wilson, Li, & Equiza (2011) mostraron que el uso de un spray tópico consiguió reducir al 5 % las lesiones de necrosis en frutos de tomate que fueron expuestos a temperaturas menores a 0 °C por 3 h. De igual manera, el uso de partículas hidrófobas permitió retrasar la penetración del hielo en la superficie de las hojas, lo que ocasiona un menor daño a las plantas durante una helada (Fuller, Hamed, Wisniewski, & Glenn, 2003).

Con base en esta problemática y considerando que la agricultura es una de principales actividades de subsistencia para gran parte de la población ecuatoriana, se resalta la importancia de la presente investigación. La agricultura es una de las actividades económicas

más importantes del Ecuador con un aporte del 8% al PIB Nacional (Montero & Salvador, 2015). Según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos [INEC] (2016) 4.872.049,88 ha, que corresponden al 19% del territorio nacional, son utilizadas en actividades agropecuarias. Particularmente, en la Sierra, región donde las heladas son un fenómeno común, 59% del territorio es utilizado para la agricultura. Al ser una actividad que se encuentra altamente relacionada con el medio ambiente y los recursos naturales, es muy sensible a las variaciones del clima. Por tal razón, el cambio climático representa una de las amenazas más fuertes para la producción agrícola (Howden et al., 2007; Perez et al., 2010).

Bajo este contexto, el presente estudio, pretende evaluar la factibilidad del uso de microorganismos psicotolerantes como agentes bioprotectores y así aportar una solución para evitar la pérdida de cultivos a causa de las bajas temperaturas a las que los mismos son expuestos y ofrecer nuevas técnicas que mitiguen los problemas que enfrentan los agricultores ecuatorianos. El fin a largo plazo de este proyecto es contribuir con un producto biotecnológico al sector agrícola para evitar y reducir las pérdidas de cultivos andinos a causa de las heladas, para lo cual se han planteado los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

Objetivo general

- Caracterizar microorganismos resistentes a bajas temperaturas aislados de suelo de páramo para la generación de sustancias poliméricas extracelulares (EPS).

Objetivos específicos

- Aislar y caracterizar morfológica y molecularmente microorganismos con capacidad de sobrevivir en bajas temperaturas.
- Evaluar las características psicotolerantes de los microorganismos aislados con posibilidad de generación de sustancias poliméricas extracelulares (EPS).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Área de estudio

El área de estudio comprende el cerro conocido como “Fierro-Urco”, ubicado en la parroquia de Santiago, provincia de Loja (3°42 '39 .3"S, 79 °18 '27 .2"W). Altitudinalmente, está enmarcado entre los 2400 m s.n.m hasta los 3900 m s.n.m. Tiene una temperatura promedio de 4 a 15 °C, con una precipitación media anual de 3000 mm (Morocho & Romero, 2003).

En esta área dominan los páramos y zonas de pajonal, la vegetación característica es de tipo arbustiva. Está representada por algunas especies como *Puya nitida*, *Weinmannia glabra*, *Miconia obscura*, *Brachyotum ledifolium*, entre otras (Lozano, 2002; Peters, Braeuning, Muenchow, & Richter, 2014).

2.1.1 Recolección de muestras

Se empleó un diseño aleatorizado para coleccionar 10 muestras de suelo en un rango altitudinal entre 3457 m s.n.m y 3651 m s.n.m. Las muestras fueron tomadas utilizando una pala pequeña, se la introdujo en el suelo a una profundidad de aproximadamente 15 cm y se guardó el suelo coleccionado en fundas selladas. Posteriormente fueron transportadas al laboratorio de Cultivo y Conservación de Microorganismos de la Universidad Técnica Particular de Loja, en donde fueron almacenadas a 4 °C hasta su uso en esta investigación.

2.2 Enriquecimiento y aislamiento de microorganismos

La metodología empleada para el aislamiento de los microorganismos fue una adaptación de la técnica usada por Subramanian et al. (2016). El medio de cultivo utilizado fue un medio mínimo (MM) que consistió en: 0,05 % K_2HPO_4 (w/v), 0,02 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (w/v), 0,1 % glucosa (w/v), 0,2 % solución traza (v/v). La solución traza contiene (w/v) 0,5 % H_3BO_3 , 0,04 % $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,2 % $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0,4 % $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,2 % NH_4MoO_4 y 0,4 % $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. Además, se usó peptona al 10% (w/v), la cual se añadió 5 mL por cada litro de medio. Finalmente, para la solidificación del medio se utilizó Bacto Agar al 1,5 %.

Previo a la fase de enriquecimiento y aislamiento se preparó una muestra madre mezclando las 10 muestras coleccionadas en un solo recipiente. Para el enriquecimiento se colocaron 10 g de la muestra en 100 mL de caldo de medio mínimo durante 48 horas a 4 °C. Al finalizar el periodo de enriquecimiento, 1 mL del caldo fue sometido a diluciones en serie de (10^{-2} hasta 10^{-8}). Se tomó 100 μ L de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} que fueron sembrados y esparcidos con asas de Digiralsky en cajas Petri con MM solidificado y fueron incubadas a 4 °C.

Una vez que se observó el apareamiento de colonias, se eligieron aquellas que presentaron diferente morfología para obtener cultivos puros. La metodología de siembra utilizada fue la de estrías por cuadrantes (Anexo 1).

2.3 Caracterización morfológica de microorganismos aislados

Para describir morfológicamente los aislados se utilizó técnicas macroscópicas, microscópicas y tinción Gram. Las características macroscópicas de los cultivos evaluadas fueron: forma, borde, textura, elevación y color de la colonia (Vasanthakumari, 2007; Breakwell, Woolverton, Macdonald, Smith, & Robison, 2016). La caracterización microscópica se realizó mediante el uso de un microscopio de contraste de fases (MOD Pluss ZEISS AXIO) y se evaluó la forma y el tamaño de las células (Al-mohana, 2016). Finalmente, la tinción Gram se realizó mediante el protocolo indicado por Alcamo & Warner (2009) (Anexo 2).

2.4 Caracterización molecular de microorganismos aislados

A continuación, se describen los pasos seguidos para caracterizar molecularmente los microorganismos aislados.

2.4.1 Extracción de ADN

Con el fin de obtener una alta concentración celular, se sembró las cepas en medio líquido MM (el mismo medio utilizado para el aislamiento) y se colocaron en un agitador (Thermo Scientific) a velocidad de 100 rpm a 4 °C por 48 h. Transcurrido este tiempo, se transfirió 1,5 mL de cada cultivo a tubos Eppendorf para luego centrifugar las muestras a 13200 rpm por un minuto o hasta evidenciar la formación de pellet. Para la extracción de ADN, se eliminó el sobrenadante sin tocar el pellet y se siguió el protocolo del kit comercial PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) (Anexo 3). La cuantificación del ADN extraído se realizó mediante el uso de Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). El ADN fue almacenado a -20 °C hasta continuar con los siguientes procesos.

2.4.2 Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se realizaron a un volumen final de 25 µL, usando los reactivos detallados en la Tabla 1. La concentración del molde de ADN fue de aproximadamente 20 µg/mL. El gen 16S rRNA fue amplificado con el uso de los primers universales 27F y 1492 R de secuencias: 5'- GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' y 5'- TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3' respectivamente (Suzuki & Giovannoni, 1996). La amplificación se llevó a cabo en el termociclador SimpliAmp (Applied Biosystems) bajo las condiciones indicadas en la Tabla 2.

Tabla 1. Reacción PCR en volumen final de 25 μ L.

Reactivo	Cantidad (μ L)	Concentración final
<i>Buffer Green</i> (PROMEGA)	5	1X
MgCl ₂ (PROMEGA)	1,5	1,5 mM
Primer F (Invitrogen)	0,5	0,5 pM
Primer R (Invitrogen)	0,5	0,5 pM
Go Taq polimerasa (PROMEGA)	0,125	0,025 u/ μ l
H ₂ O	11,8	

Fuente: Autora
Elaboración: Autora

La amplificación del fragmento de interés se comprobó mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Los productos de PCR que tuvieron el tamaño de amplicón esperado (1200 a 1300 pares de bases) fueron purificados con el kit comercial PureLink PCR Purification Kit (Thermo Scientific) siguiendo el protocolo establecido por el proveedor.

Tabla 2. Condiciones establecidas para PCR.

Etapa	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	2 min	1
Desnaturalización	95	45 s	35
Anillamiento	50	45 s	
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	5 min	1

Fuente: Protocolo modificado de GoTaq DNA Polimerasa
Elaboración: Autora

2.4.3 Análisis de secuencias

Las muestras de ADN purificado fueron secuenciadas mediante el método Sanger en Macrogen (Korea), posteriormente se utilizó la herramienta BLAST del portal NCBI (disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para comparar los resultados obtenidos con secuencias conocidas y depositadas en la base de datos GenBank. En base a los porcentajes de identidad y cobertura de cada secuencia, se escogió las 5 secuencias más similares para cada secuencia obtenida. Posteriormente, se realizó un alineamiento con el programa MAFFT utilizando el algoritmo G-INS-i (Kato, Misawa, Kuma, & Miyata, 2002).

La construcción del árbol filogenético se realizó con la ayuda del programa de análisis genético y evolución Mega7 (Kumar, Stecher, & Tamura, 2015) y se empleó el método Neighbour-Joining con 1000 réplicas de bootstrap.

2.5 Caracterización de la psicrotolerancia de los microorganismos aislados

A continuación, se explica el procedimiento para evaluar las características psicrotolerantes de los microorganismos aislados.

2.5.1 Cinética de crecimiento de microorganismos aislados

Se planteó determinar la cinética de crecimiento de tres aislados, representativos de los morfotipos 1 y 2 para así conocer las características cinéticas de cada uno y determinar el tiempo de crecimiento y su fase de muerte. En base a esta información se estableció el tiempo de crecimiento a utilizar en el experimento de psicrotolerancia.

Las cinéticas de crecimiento de cada aislado se realizaron por duplicado. En primer lugar, se procedió a sembrar los aislados en medio líquido MM a 4 °C y 100 rpm (Li, Li, Wang, & Wang, 2010; Bernaldo, 2016). Para que las cepas se adapten al medio se las mantuvo creciendo por dos semanas bajo las condiciones antes mencionadas y se realizó repiques cada 3 días.

Una vez que se evidenció crecimiento microbiano (a través de observación de cambio de color de medio o aumento de turbidez), se inoculó una concentración inicial de 5×10^6 células/mL en matraces de 150 mL con un volumen de trabajo de 20 mL. Se recolectó muestras cada 12 horas y se procedió al conteo celular hasta que las bacterias alcanzaron su etapa estacionaria. Los conteos celulares se realizaron con una cámara de Neubauer de 0,02 mm de profundidad y se observaron en el microscopio de contraste de fases con el lente de 100x. Para determinar la concentración celular (bacterias/ mL) se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{concentración} \left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{número de células contadas} \times \text{FD} \times 1000}{\text{área} \times \text{profundidad}}$$

Dónde:

Área = 0,04 mm²

Profundidad = 0,02 mm

1000 = factor para obtener el número de células en 1mL

FD = factor de dilución

Adicionalmente, se procedió a calcular el tiempo de duplicación o tiempo de generación de las tres cepas mediante la siguiente fórmula:

$$G = \frac{T}{3,3 \times \log\left(\frac{N}{N_0}\right)}$$

Dónde:

G = tiempo de duplicación

T = intervalo de tiempo

N = número de bacterias al final del intervalo de tiempo

No = número de bacterias al inicio del intervalo de tiempo

2.5.2 Diseño experimental para evaluar la psicrotolerancia en los aislados

La metodología empleada para este ensayo es una adaptación de lo realizado por Wang, Sipilä, & Overmyer (2016). En un matraz de 150 mL, se colocó 20 mL de medio líquido y con un asa de inoculación se procedió a sembrar una cepa a partir de un cultivo puro en medio sólido. Los cultivos fueron colocados en un agitador orbital (100 rpm) a 4 °C y se los dejó crecer durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, se contó 1×10^6 células/mL y se sembró esta cantidad de bacterias en un nuevo matraz con medio líquido. Se homogeneizó la muestra y de este segundo cultivo, el cual contenía una concentración bacteriana inicial controlada, se tomó 5 µL que luego se mezclaron con 10 µL de medio estéril en un tubo Eppendorf. Seguido a esto, se centrifugó los tubos a 7000 rpm por 30 segundos. Se sembró la mezcla de 15 µL en cajas Petri y con la ayuda de asas de Digralsky se esparció la muestra. Finalmente, las cajas Petri fueron incubadas a 4 °C, 27 °C y 37 °C para posteriormente calcular el número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL). El ensayo se realizó por triplicado.

En primer lugar, se procedió a realizar el recuento de colonias en placa para lo cual se estableció que el recuento en 4 °C se realizaría al transcurrir 10 días. Por otro lado, para las cajas incubadas a 27 °C y 37 °C, el conteo se realizó a los tres días de incubación. Para determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{\text{número de colonias} \times FD}{\text{volumen sembrado}}$$

Además, se observó las cajas Petri cada 24 horas y se registró el tiempo (días) en los que existió apareamiento de las primeras colonias.

2.5.3 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el test no paramétrico Kruskal-Wallis para identificar diferencias estadísticamente significativas entre los datos obtenidos y de esta manera realizar una categorización de las cepas en función de su resistencia a las diferentes temperaturas.

3. RESULTADOS

3.1 Enriquecimiento y aislamiento de microorganismos

La metodología empleada permitió observar el apareamiento de colonias a partir del séptimo día de incubación. Además, se consiguió aislar un total de 10 cepas puras bacterianas que posteriormente fueron caracterizadas. No se aislaron levaduras ni hongos con el medio de cultivo y condiciones utilizadas.

3.2 Caracterización morfológica de microorganismos aislados

Las características macroscópicas de los aislados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Características macroscópicas de los microorganismos aislados

Cepa	Borde colonia	Forma colonia	Textura	Elevación	Color	Morfotipo
M1	Entero	Circular	Mucoide	Convexa	Blanca	1
M2	Entero	Circular	Mucoide	Convexa	Blanca	1
M3	Entero	Circular	Mucoide	Convexa	Blanca	1
M4	Entero	Circular	Creмоса	Convexa	Crema	2
M5	Entero	Circular	Creмоса	Convexa	Crema	2
M6	Filamentoso	Rizoide	Creмоса	Plana	Blanca	3
M7	Filamentoso	Rizoide	Creмоса	Plana	Blanca	3
M8	Entero	Circular	Mucoide	Convexa	Blanca	1
M9	Ondulado	Irregular	Mucoide	Umbonada	Blanca	4
M10	Ondulado	Irregular	Mucoide	Umbonada	Blanca	4

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Se determinó la presencia de 4 morfotipos que tienen características macroscópicas en común. El morfotipo 1 tiene una textura mucoide, elevación convexa, color blanco, borde de la colonia entero y su forma es circular. A este morfotipo pertenecieron los aislados M1, M2, M3 y M8 (Tabla 3).

Por otro lado, el morfotipo 2 tuvo las mismas características de elevación, borde y forma de colonia que el morfotipo 1; sin embargo, tiene una textura cremosa y color crema. Los aislados M4 y M5 se identificaron dentro de este grupo. Los aislados M6 y M7 conforman el morfotipo 3, el mismo que presenta características muy diferentes. Tiene una elevación plana, el borde de la colonia es filamentosos y la forma de la colonia es rizoide. Finalmente, el morfotipo 4 tiene una elevación umbonada, borde de colonia ondulado y su forma es irregular. Las muestras M9 y M10 son parte de este morfotipo. Fotografías de cada morfotipo se presentan en el Anexo 4.

La observación de las cepas aisladas con el uso de técnicas microscópicas permitió identificarlos preliminarmente como bacterias debido al tamaño que presentan. Además, se presenta qué forma tienen y su resultado con respecto a la tinción Gram realizada como se indica en la Tabla 4.

Tabla 4. Características microscópicas y tinción.

Cepa	Forma	Tamaño (µm)	Tinción Gram
M1	Coco	1	Negativo
M2	Bacilo	2	Negativo
M3	Coco	1,5	Negativo
M4	Cocobacilo	1,5	Negativo
M5	Cocobacilo	2	Negativo
M6	Bacilo	2,5	Negativo
M7	Bacilo	2	Negativo
M8	Bacilo	1,5	Negativo
M9	Cocobacilo	2	Negativo
M10	Coco	2	Negativo

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

3.3 Caracterización molecular y filogenia

Se obtuvo un total de 8 secuencias de entre 800 a 1000 pares de bases. No se pudo obtener secuencias de dos de las cepas aisladas (M7 y M10). De acuerdo al análisis de homología en BLAST, todas las secuencias presentaron un porcentaje de identidad mayor al 95% con respecto a las secuencias homólogas almacenadas en la base de datos de GenBank. Se consiguió identificar la presencia de 3 géneros: *Pseudomonas*, *Rahnella* y *Janthinobacterium*. Adicionalmente, se realizó un árbol filogenético utilizando las secuencias homólogas de GenBank y las secuencias de las cepas aisladas (Figura 1).

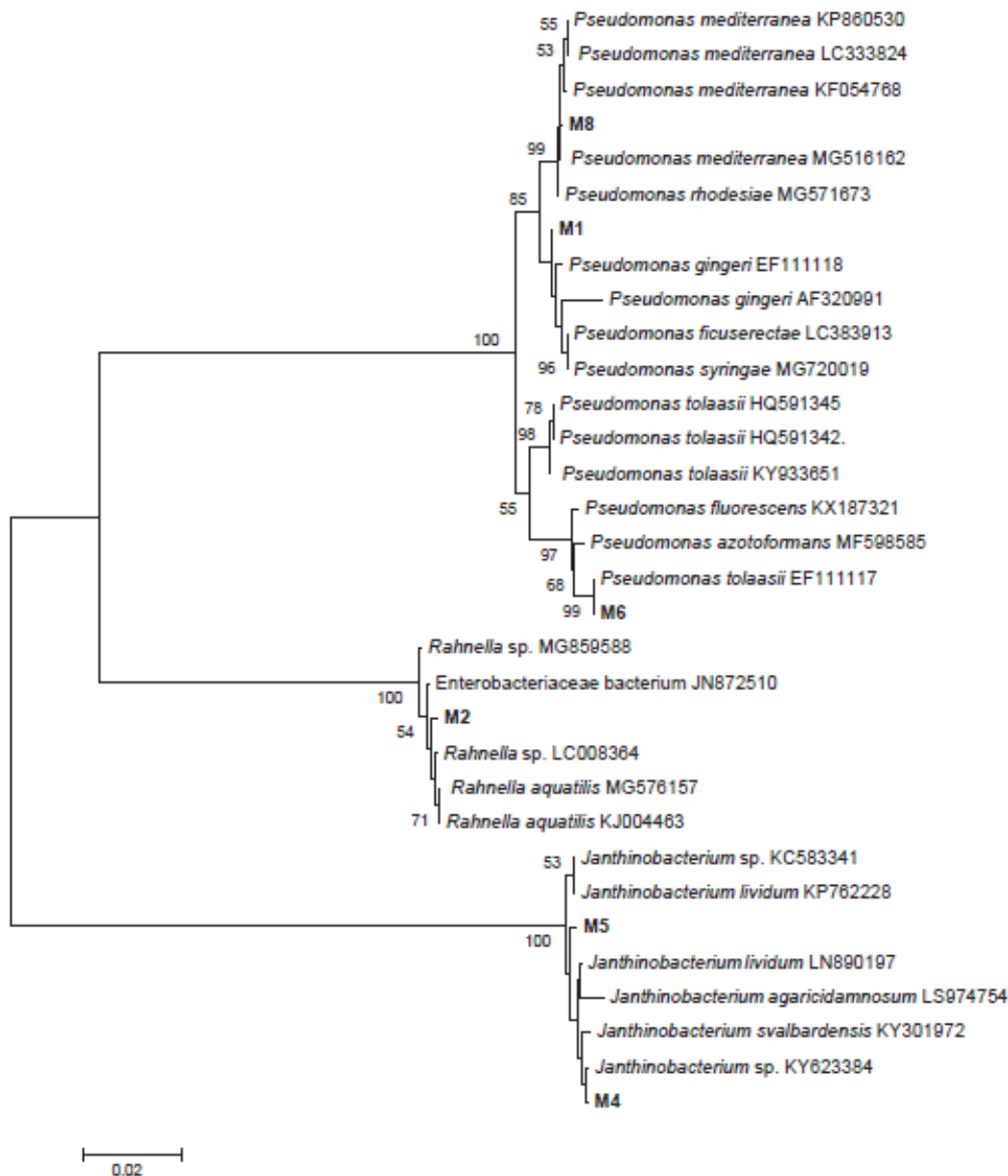


Figura 1. Árbol filogenético de la región 16s rRNA. El árbol fue construido utilizando el método Neighbour- Joining y los valores de bootstrap mayores al 50 % se muestran sobre las ramas. Las secuencias obtenidas en la presente investigación se muestran en negrita. El árbol fue enraizado en punto medio (midpoint root).

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Se decidió no incluir en el análisis filogenético las secuencias de los aislados M3 y M9, debido a que las secuencias obtenidas no fueron de buena calidad y no se acoplaron al alineamiento realizado. No obstante, para su identificación se utilizó solamente el análisis de homología en BLAST, el cual permitió clasificar al aislado M3 dentro del género *Pseudomonas*. Por otro lado, el aislado M9 no presenta homología solo con una especie o género; por lo tanto, no se la pudo identificar a ese nivel. Sin embargo, todos los posibles géneros con los que presenta similitud pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, por lo que se la clasificó a ese nivel. Para la asignación de identidad molecular con esta herramienta se consideró su porcentaje de identidad y cobertura (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados de análisis de homología en BLAST para muestras M3 y M9.

Muestra	Especie en BLAST	Porcentaje de identidad	E-value
M3	<i>Pseudomonas gingeri</i> strain RBE1CD-71	99	0
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>syringae</i> strain 1770	99	0
	<i>Pseudomonas syringae</i> strain DDH 16S	99	0
	<i>Pseudomonas ficuserectae</i> JCM 2402	99	0
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>syringae</i> strain YILI5-B	99	0
M9	<i>Rahnella</i> sp. strain S13S3LMR162	95	1e-175
	<i>Uncultured Serratia</i> sp. clone V177	95	4e-175
	<i>Rahnella</i> sp. strain AL45	95	4e-175
	<i>Rahnella aquatilis</i> strain CP A4	95	4e-175
	<i>Hafnia</i> sp. strain CP B7	95	4e-175

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

A través del análisis de la región 16S se observó que las cepas aisladas se agruparon en 3 clados muy soportados con un valor de 100. Por tanto, se las identificó de la siguiente manera: M1; *Pseudomonas* sp., relacionado a *P. gingeri*, M2; *Rahnella* sp., M4 y M5; *Janthinobacterium* sp., M6; *Pseudomonas* cf. *tolaasii* y M8; *Pseudomonas mediterranea*.

3.4 Cinética de crecimiento de microorganismos aislados

Las cinéticas de crecimiento de los aislados M1, M3 y M5, los cuales fueron representativos de los morfotipos 1 y 2 previamente adaptados a crecer en medio líquido se presentan en la Figura 2.

Se observa que entre 24 a 60 h los tres aislados llegan a la fase de crecimiento exponencial. En este tiempo, el aislado M1 alcanzó $2,6 \times 10^8$ células/mL; M3: $2,1 \times 10^8$ células/mL y M5: $2,8 \times 10^8$ células/mL. Además, luego de las 60 h existió un leve decrecimiento en el número de bacterias por mililitro. Para los ensayos posteriores de psicotolerancia, se determinó a las 48 h como el tiempo óptimo para el crecimiento bacteriano. Asimismo, se determinó su tiempo de duplicación, que en el caso de la muestra M1 fue 8,8 h, para el caso de la muestra M3 fue 6,3 h y para M5 tuvo un tiempo de duplicación de 9,3 h.

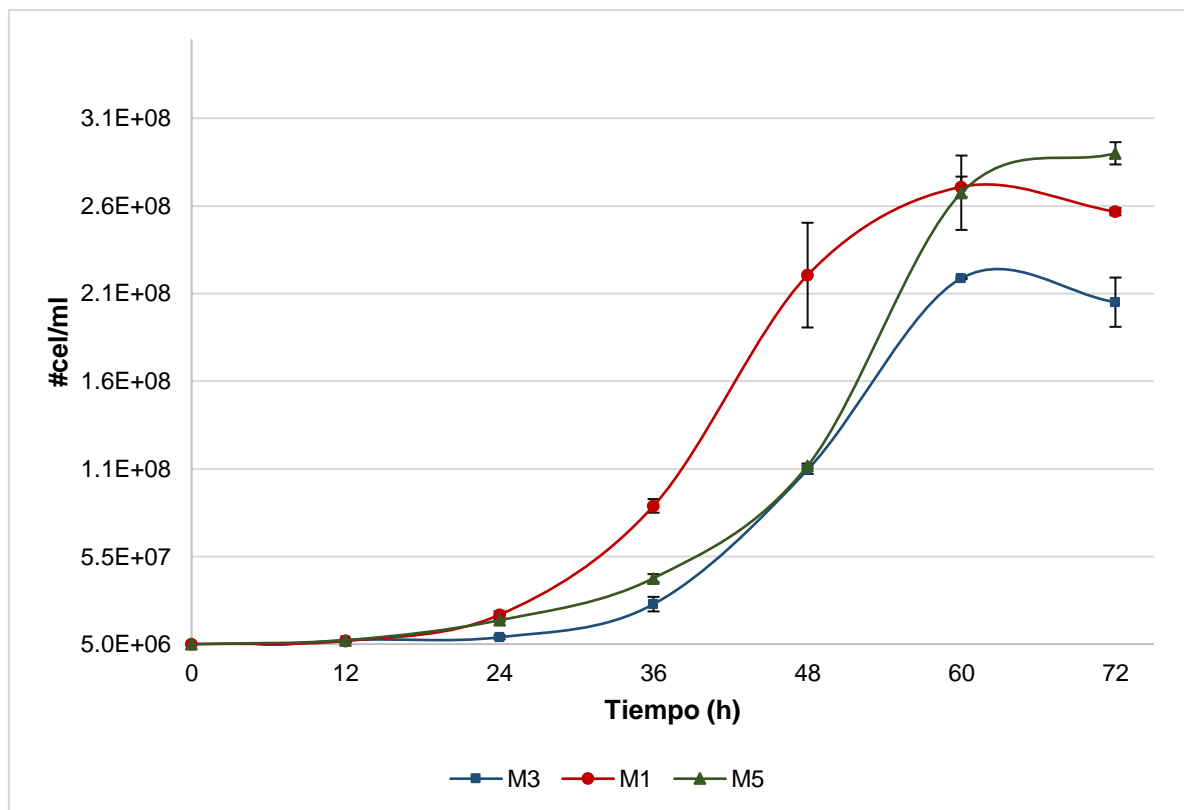


Figura 2. Cinética de crecimiento de tres aislados (M1, M3 y M5) a 4 °C.

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

3.5 Evaluación de características psicotolerantes

A partir de los ensayos anteriormente descritos, se procedió con el análisis de psicotolerancia para los 7 microorganismos aislados, debido a que las muestras M8, M9 y M10 no pudieron ser evaluadas por sus características fenotípicas. Los resultados del número de UFC/mL de los otros 7 aislados a diferentes temperaturas se muestra en la Figura 3.

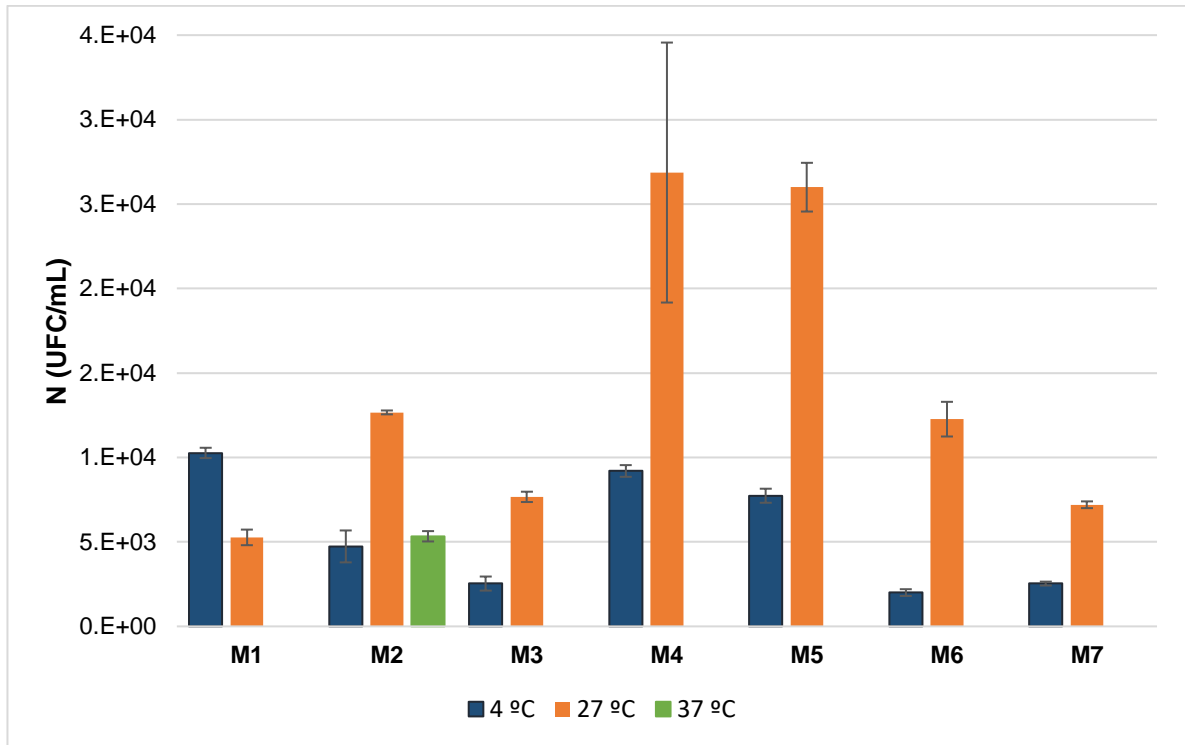


Figura 3. Unidades formadoras de colonias (UFC/mL) para siete microorganismos aislados (M1, M2, M3, M4, M5, M6 y M7) en tres temperaturas. El tiempo de incubación utilizado para 4 °C fue de 10 días, para 27 °C y 37 °C fue tres días. Las barras representan la media de las tres réplicas realizadas y se muestra la desviación estándar.

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

En la Figura 3, se puede observar que la mayor formación de UFC/mL en todos los casos, a excepción de M1, sucedió cuando los cultivos fueron crecidos 27 °C; siendo el de mayor crecimiento la cepa M4 (*Janthinobacterium* sp.) y el de menor crecimiento la cepa M1. Por otro lado, la cepa M1 (*P. mediterranea*) generó mayor cantidad de unidades formadoras de colonias en la temperatura de 4 °C. Al contrario que la cepa M6 (*Pseudomonas* cf. *tolaasii*), la cual produjo un menor número de UFC/mL a dicha temperatura. Además, es importante resaltar que solamente el aislado M2, *Rhanella* sp., fue capaz de crecer a 37 °C. De acuerdo al test estadístico Kruskal-Wallis se puede indicar que existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el número de colonias formadas por las cepas aisladas a las temperaturas de 4 °C, 27 °C y 37 °C.

Por otro lado, el número de días en los que se observó el apareamiento de colonias se registra en la Tabla 6. Como se puede verificar para el caso de todos los aislados, la temperatura en donde se requirió un menor tiempo para observar colonias fue a 27 °C. Los aislados M1, M2, M5, M6 y M7 necesitaron de un día para el apareamiento de colonias, mientras que la formación de colonias de las muestras M3 y M4 se llevó a cabo en dos días.

A 4 °C, los microorganismos requirieron de mayor tiempo para la formación de colonias (entre 6 a 8 días), siendo las cepas M4 y M5, ambas identificadas como *Janthinobacterium* sp., las que menor tiempo necesitaron (6 días).

El apareamiento de colonias de M2 (*Rahnella* sp.) se dio en un total de ocho días, mientras que las cepas M3 (*Pseudomonas*), M6 (*Pseudomonas tolaasii*) y M7 se pudieron observar colonias en un tiempo de siete días.

En el caso de los cultivos incubados a 37°C, se puede indicar que no existió crecimiento microbiano, excepto para el caso del cultivo M2, el cual requirió de dos días para permitir la observación de colonias.

Tabla 6. Tiempo de apareamiento de colonias para cada temperatura probada.

Temperatura Cepa aislada	Tiempo (días)		
	4 °C	27 °C	37 °C
M1	7	1	-
M2	8	1	2
M3	7	2	-
M4	6	2	-
M5	6	1	-
M6	7	1	-
M7	7	1	-

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

4. DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento, caracterización morfológica y molecular de microorganismos

Los géneros que se consiguieron aislar en este estudio han sido también aislados de la rizósfera de ambientes similares. Por ejemplo Vyas et al (2010) reporta el aislamiento y caracterización de una bacteria del género *Rahnella* y destaca sus características de psicrotolerancia al ser capaz de sobrevivir en bajas temperaturas. De igual manera, en su estudio Männistö & Häggblom (2006) obtuvieron 7 aislados del género *Janthinobacterium* y 34 cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*. Adicionalmente, comprobaron que las cepas de *Janthinobacterium* fueron capaces de crecer a 0 °C, pero no pudieron crecer a 35 °C por lo que se clasificaron como psicrotolerantes. Asimismo, Smith et al. (2013) informan el aislamiento de *Janthinobacterium* sp. strain CG3 de un glaciar en la Antártida. *Janthinobacterium* sp. es una bacteria psicrotolerante y es similar a las cepas aisladas en este estudio (M4 y M5) porque tiene la característica de no producir el pigmento violaceína, generalmente producido por algunas cepas del mismo género.

La identidad taxonómica asignada a las especies aisladas en este trabajo coincide con sus características morfológicas microscópicas descritas en la literatura. La forma, tamaño y tinción Gram de *P. gingeri*, *P. mediterranea*, *P. tolaasii*, *Janthinobacterium* sp. y *Rahnella* sp. se corroboran con los datos publicados en estudios similares (Breed, Murray, & Smith, 1957; Catara et al., 2002; Gillis & Logan, 2015; Kämpfer, 2015).

Por otra parte, las características macroscópicas de las especies que se estudiaron no se contrastaron con otros trabajos publicados. La comparación no se realizó porque la descripción disponible de la morfología de colonias bacterianas se realizó en otros medios de cultivo diferentes al usado en este estudio. Sousa, Machado, Nicolau, & Pereira (2013) evaluaron el impacto que tienen algunas variables, entre ellas el medio de cultivo, sobre las características de las colonias bacterianas. Sus resultados mostraron que el tipo de medio influyó en la morfología de las colonias puesto que dos cepas de *Pseudomonas aeruginosa* exhibieron diferentes características al ser sembradas en TSA, PIA y CET. Además, encontraron que el margen, textura y color fueron las características morfológicas más afectadas. Por lo tanto, se decidió que no sería adecuado comparar los rasgos morfológicos macroscópicos.

En la presente investigación se identificó tres posibles especies del género *Pseudomonas*: *P. tolaasii*, *P. gingeri* y *P. mediterranea*. Debido a que se pretende utilizar alguna de estas cepas para aplicaciones biotecnológicas relacionada con plantas, se indagó sobre sus características y se encontró que dichas especies tienen actividad patógena.

P. tolaasii y *P. gingeri* son patógenos para algunos hongos comestibles (Paine, 1919; Wong, Fletcher, & Unsworth, 1982). Por otro lado, *P. mediterranea* es una bacteria que habita el suelo, pero se han descrito algunas cepas que bajo ciertas condiciones pueden causar la enfermedad necrosis medular del tomate o pueden sobrevivir como microorganismos endófitos ya sea en las plantas o en la rizósfera (Moura, Brito, Mourão, Jacques, & Duclos, 2005; Catara, 2007).

Además, se manifiesta que *P. tolaasii* puede vivir como un microorganismo saprófito o patógeno (Soler-Rivas, Jolivet, Arpin, Olivier, & Wichers, 1999). *P. tolaasii* ha sido aislada principalmente de hongos ya que causa la enfermedad “mancha marrón” en *Agaricus bisporus* y *Flammulina velutipes* (Abou-Zeid, 2012; Han et al., 2012). No obstante, *P. tolaasii* también se ha encontrado en la rizósfera de diferentes lugares (Amico, Cavalca, & Andreoni, 2005; Garbeva, Van Elsas, & Van Veen, 2008; Viruel, Lucca, & Siñeriz, 2011). Además de haber sido identificada como una bacteria patógena, *P. gingeri* también ha sido reportada como una bacteria endófito en plantas de papa (Reiter, Wermbter, Gyamfi, Schwab, & Sessitsch, 2003).

4.2 Cinética de crecimiento de microorganismos aislados

En cultivo por lotes el ciclo de crecimiento bacteriano consta de cuatro fases: la de latencia, exponencial, estacionaria y de muerte (Madigan et al., 2009). En las tres cinéticas de crecimiento realizadas se observa una fase de latencia que se extiende hasta las 24 horas aproximadamente, la fase exponencial empieza a partir de este tiempo y dura hasta las 60 horas aproximadamente y finalmente la fase estacionaria que dura entre las 60 hasta las 72 horas. Se puede observar que en la fase de crecimiento exponencial los microorganismos duplican su crecimiento. Se puede indicar que la fase estacionaria de estos cultivos fue corta, únicamente de 12 h, en donde se verifica que empieza su fase de decrecimiento. Esto coincide con lo reportado por Zhou, Zheng, Dou, Cai, & Yuan (2010), quienes observaron que al crecer en 7 °C una bacteria psicotolerante atravesó una fase estacionaria no significativa (24 horas) y alcanzó los valores más altos de densidad óptica (OD_{600nm}) a los tres días. Por lo tanto, su fase estacionaria empezó a las 60 horas.

Asimismo, Kiran et al. (2004) registraron que el crecimiento de la bacteria psicrófila *Pseudomonas syringae* en 5 °C es similar a los resultados obtenidos en este estudio. Al igual que *P. syringae*, los aislados M1 y M3 (pertenecientes al mismo género) empiezan su fase exponencial alrededor de las 24 horas y esta fase termina cerca de las 70 horas.

4.3 Características psicotolerantes de microorganismos aislados

Dentro del género *Pseudomonas*, muchas especies han sido identificadas como psicotolerantes. Algunas de ellas incluyen a *P. ficuserectae*, *P. guineae*, *P. lurida* y *P. migulae*

(Bozal & Mercade, 2007; Selvakumar et al., 2011; Subramanian et al., 2016). Sin embargo, las tres especies de *Pseudomonas* identificadas en este estudio no han sido reportadas como psicrotolerantes, aunque sí se pudo evidenciar su capacidad para crecer a 4 °C.

En cambio, microorganismos de los géneros *Rahnella* y *Janthinobacterium* ya han sido reconocidos previamente como psicrotolerantes. De manera que, *Janthinobacterium lividum* ha sido reportada como una bacteria psicrotolerante común en suelo de regiones frías y templadas (Shivaji et al., 1991).

Los resultados obtenidos permiten observar que existe una tendencia a formar más unidades formadoras de colonias en 27 °C que en 4 °C. Esto puede deberse a que la temperatura óptima de crecimiento de los microorganismos psicrotolerantes es mayor a 15 °C (Moyer & Morita, 2007). La temperatura óptima de crecimiento es la temperatura en la cual los microorganismos crecen más rápido y los componentes celulares trabajan a su máxima velocidad (Madigan et al., 2009; Sumbali & Mehrotra, 2009). Por lo tanto, los microorganismos aislados crecieron mejor a 27 °C y formaron un mayor número de UFC/mL.

La presencia de más UFC en 27 °C ocurrió con todos los aislados a excepción de M1, el cual presentó mayor número de colonias en 4 °C. Esto es similar a lo encontrado por Margesin (2009) en donde se estudió el efecto de la temperatura sobre parámetros de crecimiento en bacterias y levaduras psicrófilas. Los resultados indicaron que el número de células viables (medido en UFC/ml) fue mayor en 1 °C que en 20 °C; lo cual significa que algunos microorganismos producen una mayor biomasa y tienen un mejor rendimiento en temperaturas lejanas a su temperatura óptima de crecimiento.

Por otra parte, el menor tiempo para el apareamiento de colonias en 27 °C que en 4 °C se puede explicar por dos razones. Primero, 27 °C está cerca de la temperatura óptima de crecimiento de los psicrotolerantes (20-30 °C). En segundo lugar, se ha registrado que en temperaturas más altas existe un menor tiempo de generación en bacterias psicrotolerantes (Holmes, Nicoll, Bond, & Lovley, 2004). El tiempo de generación o tiempo de duplicación es el tiempo requerido para que ocurra la división celular (Srivastava & Srivastava, 2003). Feller et al. (1994) reportó menores tiempos de duplicación en 25 °C que en 4 °C. *Alteromonas haloplanctis* presentó un tiempo de generación de 1,2 h en 25 °C, mientras que a 4 °C el tiempo de duplicación fue 4 h. *Bacillus* sp. tuvo un tiempo de generación de 2 h a 25 °C y de 9,5 h a 4 °C. Por consiguiente, al tener menores tiempo de duplicación en 27 °C, las colonias aparecieron más pronto. Asimismo, los tiempos de duplicación calculados a 4 °C (entre 6,3 h y 9,3 h) se asemejan a los reportados para microorganismos psicrófilos (Brenchley, 1996).

Subramanian et al. (2016) obtuvo resultados similares a los hallados en este trabajo con respecto al tiempo de apareamiento de colonias en dos temperaturas probadas. De igual

manera, estos autores observaron que el apareamiento de colonias en 5 °C tardó más días que en 25 °C. Además, reportan un tiempo entre tres a cinco días para el apareamiento de colonias a 5 °C para varias especies del género *Pseudomonas* y a 25 °C registraron el apareamiento de colonias en un día.

Por último, la mucosidad que tienen las muestras M8, M9 y M10 hizo que el medio sea muy denso, lo que imposibilitó la contabilización del número de bacterias y por lo tanto la aplicación de la metodología planteada. Se presume que la mucosidad producida por dichas cepas se debe a que producen EPS. Existen varios registros sobre el rol ecológico del EPS y su importancia como crioprotector en bacterias psicrotolerantes, incluyendo algunos especímenes de los géneros encontrados en esta investigación (Pantanella et al., 2007; Qin, Zhu, Chen, Wang, & Zhang, 2007; Celik, Aslim, & Beyatli, 2008; Marx et al., 2009; Jiang, Guo, & Li, 2010).

CONCLUSIONES

Se realizó el aislamiento de 10 cepas de bacterias psicrotolerantes, con cuatro morfotipos diferentes. A través del análisis del gen 16S rRNA se identificaron 3 géneros: *Pseudomonas*, *Rahnella* y *Janthinobacterium*.

A través de la realización de cinéticas de crecimiento se observó que tres de los microorganismos aislados tuvieron una fase de latencia de 24 horas y que su fase exponencial se mantuvo hasta las 60 horas. Además, se conoció que su tiempo de duplicación en 4 °C fue de 6,3 h a 9,3 h.

Se obtuvo una variabilidad en la respuesta a las diferentes temperaturas por parte de los 7 microorganismos evaluados. El aislado M1 (*Pseudomonas* sp. relacionado a *P. gingeri*) fue el que mayor número de unidades formadoras de colonias generó en la temperatura de 4 °C, mientras que M4 (*Janthinobacterium* sp.) formó un mayor número de UFC/mL en 27 °C.

La alta mucosidad producida por tres aislados (M8, M9 y M10) no permitió la aplicación de la metodología planteada para evaluar sus características de psicrotolerancia. Esta mucosidad puede ser causada por la presencia de EPS.

BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Zeid, M. A. (2012). Pathogenic variation in isolates of *Pseudomonas* causing the brown blotch of cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(3), 1137–1146.
- Al-mohana, M. (2016). *Morphology and classification of Bacteria*. University of Al-Qadisiyah.
- Alcamo, E., & Warner, J. M. (2009). *Schaum's outline of microbiology*. New York: McGraw Hill Professional.
- Anwar, M. R., Li Liu, D., Macadam, I., & Kelly, G. (2013). Adapting agriculture to climate change: a review. *Theoretical and Applied Climatology*, 113(2), 225–245.
- Bernaldo, J. (2016). *Diversidad molecular de consorcios microbianos lixiviantes psicrotolerantes aislados de zonas mineras de la provincia de Cerro de Pasco* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Bozal, N., & Mercade, E. (2007). *Pseudomonas guineae* sp. nov., a novel psychrotolerant bacterium from an Antarctic environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(11), 2609–2612.
- Breakwell, D., Woolverton, C., Macdonald, B., Smith, K., & Robison, R. (2016). *Colony morphology protocol*. American Society for Microbiology.
- Breed, R. S., Murray, E. G. D., & Smith, N. R. (1957). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. London: Williams & Wilkins Company.
- Brenchley, J. E. (1996). Psychrophilic microorganisms and their cold-active enzymes. *Journal of Industrial Microbiology*, 17(5), 432–437.
- Catara, V. (2007). *Pseudomonas corrugata*: plant pathogen and/or biological resource? *Molecular Plant Pathology*, 8(2), 233–244.
- Catara, V., Sutra, L., Morineau, A., Achouak, W., Christen, R., & Gardan, L. (2002). Phenotypic and genomic evidence for the revision of *Pseudomonas corrugata* and proposal of *Pseudomonas mediterranea* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(5), 1749–1758.
- Celik, G. Y., Aslim, B., & Beyatli, Y. (2008). Characterization and production of the exopolysaccharide (EPS) from *Pseudomonas aeruginosa* G1 and *Pseudomonas putida* G12 strains. *Carbohydrate Polymers*, 73(1), 178–182.
- Centinari, M., Smith, M. S., & Londo, J. P. (2016). Assessment of freeze injury of grapevine green issues in response to cultivars and a cryoprotectant product. *HortScience*, 51(7),

856–860.

- Dell' Amico, E., Cavalca, L., & Andreoni, V. (2005). Analysis of rhizobacterial communities in perennial Gramineae from polluted water meadow soil, and screening of metal-resistant, potentially plant growth-promoting bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, *52*(2), 153–162.
- Feller, G., Narinx, E., Arpigny, J. L., Zekhnini, Z., Swings, J., & Gerday, C. (1994). Temperature dependence of growth, enzyme secretion and activity of psychrophilic Antarctic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *41*(4), 477–479.
- Francko, D. A., Wilson, K. G., Li, Q. Q., & Equiza, M. A. (2011). A topical spray to enhance plant resistance to cold injury and mortality. *HortTechnology*, *21*(1), 109–118.
- Fuller, M. P., Hamed, F., Wisniewski, M., & Glenn, D. M. (2003). Protection of plants from frost using hydrophobic particle film and acrylic polymer. *Annals of Applied Biology*, *143*(1), 93–98.
- Garbeva, P., Van Elsas, J. D., & Van Veen, J. A. (2008). Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. *Plant and Soil*, *302*(1), 19–32.
- Gillis, M., & Logan, N. A. (2015). *Janthinobacterium*. In W. B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, ... S. Dedysh (Eds.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 737–749).
- Han, H., Jhune, C., Cheong, J., Oh, J., Kong, W., Cha, J.-S., & Lee, C.-J. (2012). Occurrence of black rot of cultivated mushrooms (*Flammulina velutipes*) caused by *Pseudomonas tolaasii* in Korea. *European Journal of Plant Pathology*, *133*(3), 527–535.
- Holmes, D. E., Nicoll, J. S., Bond, D. R., & Lovley, D. R. (2004). Potential role of a novel psychrotolerant member of the family Geobacteraceae, *Geopsychrobacter electrodiphilus* gen. nov., sp. nov., in electricity production by a marine sediment fuel cell. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(10), 6023–6030.
- Howden, S. M., Soussana, J. F., Tubiello, F. N., Chhetri, N., Dunlop, M., & Meinke, H. (2007). Adapting agriculture to climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(50), 19691–19696.
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos [INEC]. (2016). Encuesta de Superficie de Producción Agrícola Continua (ESPAC).
- Jiang, X. L., Guo, K., & Li, R. (2010). Study of exopolysaccharide production from *Rahnella* sp. PJT09 by fermentation. *Periodical of Ocean University of China*, *8*(1), 11–12.
- Kämpfer, P. (2015). *Rahnella*. In W. B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun,

- P. DeVos, ... S. Dedysh (Eds.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–16).
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. I., & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14), 3059–3066.
- Kiran, M. D., Prakash, J. S. S., Annapoorni, S., Dube, S., Kusano, T., Okuyama, H., ... Shivaji, S. (2004). Psychrophilic *Pseudomonas syringae* requires trans-monounsaturated fatty acid for growth at higher temperature. *Extremophiles*, 8(5), 401–410.
- Krembs, C., & Deming, W. (2008). The role of exopolymers in microbial adaptation to sea ice. In R. Margesin, F. Schinner, J.-C. Marx, & C. Gerday (Eds.), *Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology* (pp. 247–264).
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2015). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0.
- Kurukulasuriya, P., & Rosenthal, S. (2003). *Climate change and agriculture: A review of impacts and adaptations*. World Bank.
- Lagunas Bernabé, S., & Vega Castillo, L. (2013). *Manual de prácticas de laboratorio de bacteriología y micología*. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Li, Y., Li, J., Wang, C., & Wang, P. (2010). Growth kinetics and phenol biodegradation of psychrotrophic *Pseudomonas putida* LY1. *Bioresource Technology*, 101(17), 6740–6744.
- Lozano, P. (2002). Tipos de bosque en el sur del Ecuador. In *Botánica Austroecuatorialiana – Estudios sobre los recursos vegetales en las provincias de El Oro, Loja y Zamora-Chinchipe* (pp. 29–50).
- Madigan, M. T., Clark, D. P., & Bender, K. S. (2009). *Brock: Biología de los microorganismos*. Madrid: Pearson Educación.
- Männistö, M., & Häggblom, M. (2006). Characterization of psychrotolerant heterotrophic bacteria from Finnish Lapland. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(3), 229–243.
- Margesin, R. (2009). Effect of temperature on growth parameters of psychrophilic bacteria and yeasts. *Extremophiles*, 13(2), 257–262.
- Margesin, R., & Miteva, V. (2011). Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Research in Microbiology*, 162(3), 346–361.
- Margesin, R., Neuner, G., & Storey, K. B. (2007). Cold-loving microbes, plants, and animals—fundamental and applied aspects. *Naturwissenschaften*, 94(2), 77–99.

- Marx, J. G., Carpenter, S. D., & Deming, J. W. (2009). Production of cryoprotectant extracellular polysaccharide substances (EPS) by the marine psychrophilic bacterium *Colwellia psychrerythraea* strain 34H under extreme conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(1), 63–72.
- Montero, A., & Salvador, S. (2015). *Panorama agroeconómico del Ecuador una visión del 2015*. Quito: Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP).
- Morocho, D., & Romero, J. (Eds.). (2003). *Bosques del Sur. El estado de 12 remanentes de bosques andinos de la provincia de Loja*. Loja: Fundación Ecológica Arcoiris.
- Moura, M. L., Brito, L. M., Mourão, I. M., Jacques, M., & Duclos, J. (2005). Tomato pith necrosis (TPN) caused by *P. corrugata* and *P. mediterranea*: severity of damages and crop loss assessment. *International Symposium on Tomato Diseases*, 695(1), 365–372.
- Moyer, C. L., & Morita, R. Y. (2007). *Psychrophiles and Psychrotrophs*. Chichester: eLS.
- Oliver, J. E. (Ed.). (2008). *Encyclopedia of world climatology*. Dordrecht: Springer Science & Business Media.
- Paine, S. (1919). Studies in Bacteriosis II: A brown blotch disease of cultivated mushrooms. *Annals of Applied Biology*, 5(3), 206–219.
- Pantarella, F., Berlutti, F., Passariello, C., Sarli, S., Morea, C., & Schippa, S. (2007). Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. *Journal of Applied Microbiology*, 102(4), 992–999.
- Perez, C., Nicklin, C., Dangles, O., Vanek, S., Sherwood, S., Halloy, S., ... Forbes, G. (2010). Climate change in the high Andes: Implications and adaptation strategies for small-scale farmers. *International Journal of Environmental, Cultural, Economic and Social Sustainability*, 6(5), 71–88.
- Peters, T., Braeuning, A., Muenchow, J., & Richter, M. (2014). An ecological paradox: high species diversity and low position of the upper forest line in the Andean Depression. *Ecology and Evolution*, 4(11), 2134–2145.
- Qin, G., Zhu, L., Chen, X., Wang, P. G., & Zhang, Y. (2007). Structural characterization and ecological roles of a novel exopolysaccharide from the deep-sea psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM9913. *Microbiology*, 153(5), 1566–1572.
- Reiter, B., Wermbter, N., Gyamfi, S., Schwab, H., & Sessitsch, A. (2003). Endophytic *Pseudomonas* spp. populations of pathogen-infected potato plants analysed by 16S rDNA- and 16S rRNA-based denaturing gradient gel electrophoresis. *Plant and Soil*, 257(2), 397–405.

- Sakai, A., & Larcher, W. (2012). *Frost survival of plants: responses and adaptation to freezing stress*. Berlin: Springer Science & Business Media.
- Selvakumar, G., Joshi, P., Suyal, P., Mishra, P. K., Joshi, G. K., Bisht, J. K., ... Gupta, H. (2011). *Pseudomonas lurida* M2RH3 (MTCC 9245), a psychrotolerant bacterium from the Uttarakhand Himalayas, solubilizes phosphate and promotes wheat seedling growth. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5), 1129–1135.
- Shivaji, S., Ray, M. K., Kumar, G. S., Reddy, G. S. N., Saisree, L., & Wynn-williams, D. D. (1991). Identification of *Janthinobacterium lividum* from the soils of the islands of Scotia Ridge and from Antarctic peninsula. *Polar Biology*, 11(4), 267–268.
- Smith, H., Akiyama, T., Foreman, C., Franklin, M., Woyke, T., Teshima, H., ... Chain, P. (2013). Draft genome sequence and description of *Janthinobacterium* sp. strain CG3, a psychrotolerant antarctic supraglacial stream. *Genome Announcements*, 1(6), 1–2.
- Snyder, R. L., & de Melo-Abrey, J. P. (2005). *Frost protection: fundamentals, practice, and economics*. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Soler-Rivas, C., Jolivet, S., Arpin, N., Olivier, J. M., & Wichers, H. J. (1999). Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(5), 591–614.
- Sousa, A. M., Machado, I., Nicolau, A., & Pereira, M. O. (2013). Improvements on colony morphology identification towards bacterial profiling. *Journal of Microbiological Methods*, 95(3), 327–335.
- Srivastava, S., & Srivastava, P. S. (2003). *Understanding bacteria*. New Delhi: Springer Science & Business Media.
- Subramanian, P., Kim, K., Krishnamoorthy, R., Mageswari, A., Selvakumar, G., & Sa, T. (2016). Cold stress tolerance in psychrotolerant soil bacteria and their conferred chilling resistance in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) under low temperatures. *PLoS ONE*, 11(8), 1–17.
- Subramanian, P., Melvin Joe, M., Yim, W., Hong, B., Tipayno, S. C., Sivaraj, V., ... Sa, T. (2011). Psychrotolerance mechanisms in cold-adapted bacteria and their perspectives as plant growth-promoting bacteria in temperate agriculture. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*, 44(4), 625–636.
- Sumbali, G., & Mehrotra, R. S. (2009). *Principles of microbiology*. New Delhi: Tata McGraw-Hill.
- Suzuki, M. T., & Giovannoni, S. J. (1996). Bias caused by template annealing in the

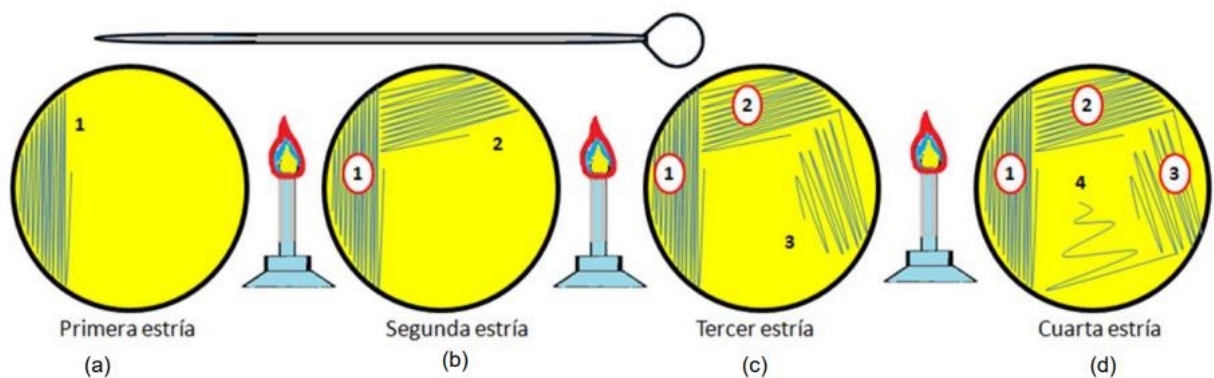
- amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 625–630.
- Van der Gulik, T. W. (1988). *B.C Frost protection guide*. Vernon: Irrigation Industry Association of British Columbia.
- Vasanthakumari, R. (2007). *Textbook of microbiology*. New Delhi: BI Publications Pvt Ltd.
- Viruel, E., Lucca, M. E., & Siñeriz, F. (2011). Plant growth promotion traits of phosphobacteria isolated from Puna, Argentina. *Archives of Microbiology*, 193(7), 489–496.
- Vyas, P., Robin, J., Sharma, K. C., Rahi, P., Gulati, A., & Gulati, A. (2010). Cold-adapted and rhizosphere-competent strain of *Rahnella* sp. with broad-spectrum plant growth-promotion potential. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(12), 1724–1734.
- Wang, K., Sipilä, T. P., & Overmyer, K. (2016). The isolation and characterization of resident yeasts from the phylloplane of *Arabidopsis thaliana*. *Nature Scientific Reports*, 6(39403), 1–13.
- Wong, W. C., Fletcher, J. T., & Unsworth, B. A. (1982). A note on ginger blotch, a new bacterial disease of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Journal of Applied Bacteriology*, 52(1), 43–48.
- Yumoto, I. (Ed.). (2013). *Cold-adapted microorganisms*. Norfolk: Caister Academic Press.
- Zhou, G., Zheng, D., Dou, L., Cai, Q., & Yuan, Z. (2010). Occurrence of psychrotolerant *Bacillus cereus* group strains in ice creams. *International Journal of Food Microbiology*, 137(2), 143–146.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1. Metodología de siembra por cuadrantes

El objetivo principal de esta técnica es obtener colonias puras y aisladas a través del estriado. Primero se procede a flamear un asa de inoculación y esperar a que se enfríe. Se toma una pequeña muestra de una colonia bacteriana y se la distribuye en el primer cuadrante. Se esteriliza nuevamente el asa de inoculación y tomando un poco de muestra del primer cuadrante se realiza la segunda estriá. Para los cuadrantes tres y cuatro se utiliza el mismo procedimiento.



Fuente: Lagunas Bernabé & Vega Castillo (2013)

Anexo 2. Tinción Gram

Previo a la tinción se debe preparar la muestra. Se procede a colocar en un portaobjetos una gota de agua estéril y con el asa previamente esterilizada se coloca la muestra bacteriana. Se flamea rápidamente el portaobjetos para fijar la muestra. Luego se procede con la tinción de la siguiente manera:

1. Colocar cristal violeta sobre la muestra por un minuto.
2. Lavar con agua destilada y añadir lugol. Esperar a que actúe por un minuto
3. Lavar con agua destilada. Agregar alcohol cetona por 30 segundos.
4. Eliminar el exceso de colorante y teñir la muestra con safranina por un minuto. Lavar la muestra y dejar secar para posteriormente observar al microscopio.

Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN utilizando el kit comercial PureLink Genomic DNA Mini Kit

1. Establezca un baño de agua o bloque de calor a 55 ° C.
2. Coseche hasta 2×10^9 Gram negativos (~ 1 mL de cultivo de E. coli durante la noche) mediante centrifugación.
3. Resuspender el sedimento celular en 180 μ L de PureLink™ *Genomic Digestion Buffer*. Añadir 20 μ L de Proteínasa K para lisar las células. Mezclar bien por breve vórtice.
4. Incube el tubo a 55 ° C con agitación ocasional hasta que se complete la lisis
5. Agregue 20 μ L de RNasa A al lisado, mezcle bien con vórtex breve e incube a temperatura ambiente durante 2 minutos.
6. Agregue 200 μ L de PureLink™ *Genomic Lysis / Binding Buffer* y mezclar bien mediante agitación con vórtex para obtener una solución homogénea.
7. Agregue 200 μ L de etanol al 96-100% al lisado. Mezcle bien agitando en vórtex durante 5 segundos para obtener una solución homogénea.

Proceso de purificación

1. Saque una columna PureLink™ con un tubo de recogida del paquete.
2. Agregue el lisado (~ 640 μ l) preparado con PureLink™ *Genomic Lysis/ Binding Buffer* tampón de unión y etanol a la columna de centrifugación.
3. Centrifugue la columna a 10,000 xg durante 1 minuto a temperatura ambiente.
4. Deseche el tubo de recolección y coloque la columna de centrifugado en un tubo de recogida PureLink™ limpio suministrado con el kit.

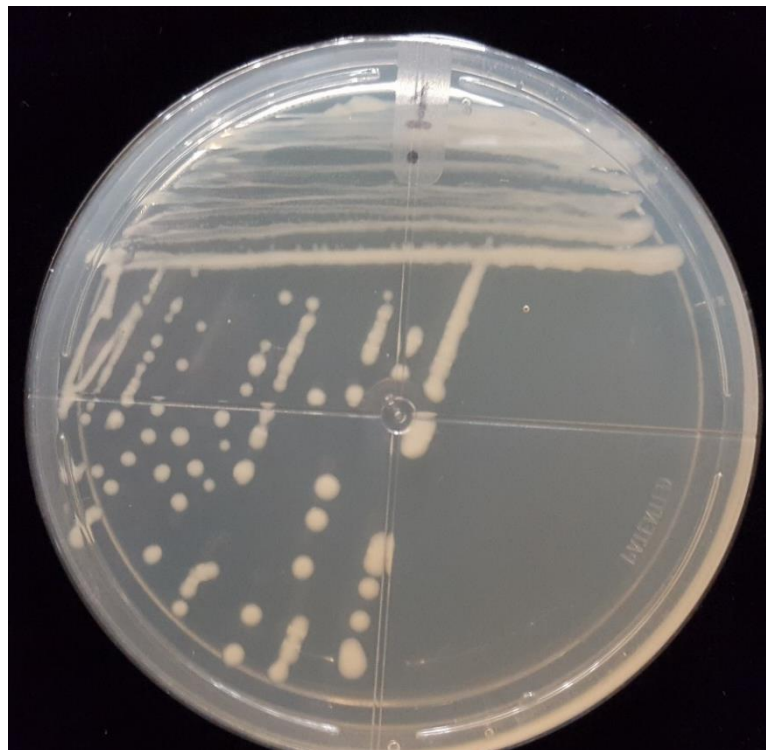
Proceso de lavado

1. Agregue 500 μ l de *Wash Buffer 1* preparado con etanol a la columna.
2. Centrifugue la columna a 10,000 xg durante 1 minuto a temperatura ambiente.
3. Deseche el tubo de recolección y coloque la columna de centrifugado en un tubo de recogida PureLink™ limpio suministrado con el kit.
4. Agregue 500 μ l de *Wash Buffer 2* preparado con etanol a la columna.
5. Centrifugar la columna a la velocidad máxima durante 3 minutos a temperatura ambiente. Deseche el tubo de recogida.

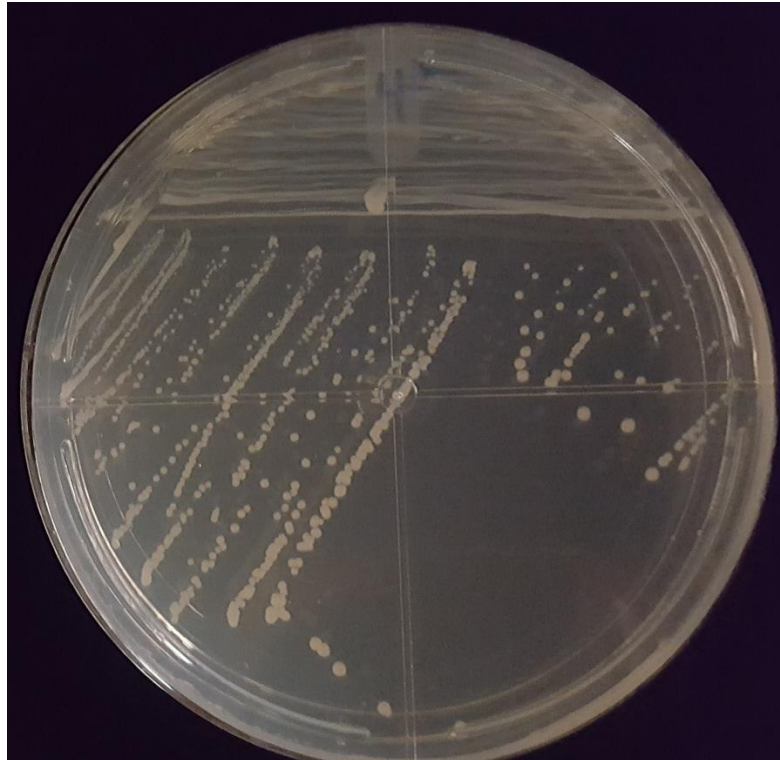
Proceso de elución

1. Coloque la columna de centrifugado en un tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 ml.
2. Agregue 25-200 μL de PureLink™ Buffer de elución genómica a la columna. Elija el volumen de elución adecuado para sus necesidades.
3. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar la columna a la velocidad máxima durante 1 minuto a temperatura ambiente.
4. Para recuperar más ADN, realice una segunda etapa de elución utilizando el mismo volumen de tampón de elución que la primera elución.
5. Centrifugue la columna a la velocidad máxima durante 1,5 minutos a temperatura ambiente. El tubo contiene ADN purificado. Retire y deseche la columna.

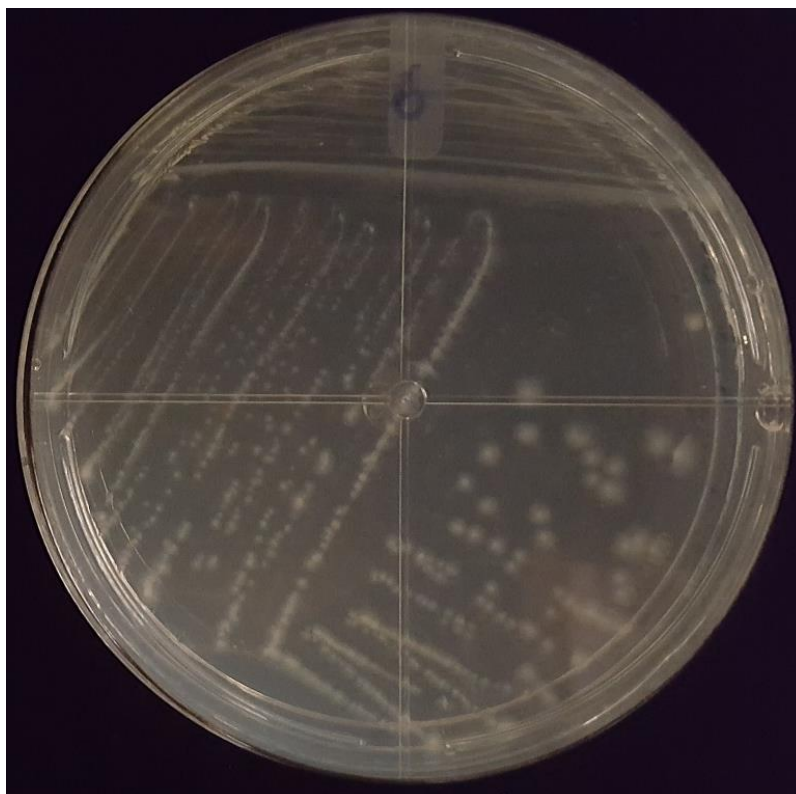
Anexo 4. Fotografías de cuatro morfotipos identificados



Morfotipo 1: textura mucoide, elevación convexa, color blanco, borde de colonia entero y forma circular



Morfotipo 2: textura cremosa, elevación convexa, color crema, borde de colonia entero y forma circular



Morfotipo 3: textura cremosa, elevación plana, color blanco, borde de colonia filamentoso y a forma rizoide



Morfotipo 4: textura mucoide, elevación umbonada, color blanco, borde de colonia ondulado y forma irregular