

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

Evaluación del posible rol ecológico de cepas bacterianas
psicrófilas y psicrotolerantes aisladas de biocostras establecidas
en el frente glacial del Pico Humboldt

Trabajo Especial de Grado

Presentado por:

Karen Andreina García Márquez

Tutor académico: Zarack Chacón

Tutor externo: Ascanio Rojas

Co-tutora: Bárbara Huber

Noviembre de 2023

Agradecimientos

- Agradezco muy especialmente el apoyo financiero del Sr. Livio Piatti, presidente de la fundación BREDOLI, Suiza, por su apoyo a la investigación en un momento crítico.
- Especial agradecimiento al Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología y a las personas que allí laboran, en especial a la señora Betty.
- A los profesores Ascanio Rojas, Bárbara Huber y Zarack Chacón, quienes me han apoyado en cada paso de esta tesis, y que más que mis tutores son amigos incondicionales. Gracias por confiar en lo que hago.
- A los profesores Wilfredo Quiñones y Luz Castro por tomarse el tiempo de leer, corregir y aportarme su conocimiento para el mejoramiento de este manuscrito.
- Agradezco a cada uno de los profesores de la Facultad de Ciencias que dedicaron su tiempo a mi enseñanza en esta hermosa carrera.
- A toda mi familia, especialmente a mis abuelos, por apoyarme en mis años de estudio y de vida.
- A mis tíos, Laura y Carlos, por ayudarme y darme cariño en cada momento.
- A mis hermanas, Karol y Kamila, por hacerme feliz en los momentos más difíciles.
- A Douglas Moreno por su compañía todo este tiempo, por ser comprensivo y tener mucha paciencia, especialmente en cada paso de realización de esta tesis.
- A todos mis amigos de facultad, por el apoyo y los grandes momentos que hemos pasado juntos.
- A los profesores Yenni Barrios y José Grande (Moncho) por incentivar me a estudiar esta carrera tan maravillosa y apoyarme todos estos años. Gracias por ser unos excelentes seres humanos.
- A todos, muchas gracias.

Resumen

En los últimos años, se ha registrado el derretimiento parcial y en algunos casos total, del hielo de los glaciares en países de latitudes tropicales. Los glaciares ubicados en la Cordillera de los Andes han sido severamente afectados por el cambio climático dada la combinación de una elevada altitud y una baja latitud en esta región. El glaciar del Pico Humboldt, ubicado en la Sierra Nevada de Mérida, Venezuela, está por desaparecer. Al retirarse, éste ha dejado un paisaje de roca desnuda que está siendo colonizada por una gran variedad de especies. A este proceso de colonización se le conoce como sucesión primaria. Una de las comunidades más representativas de estos procesos sucesionales en regiones desérticas frías son las costras biológicas o biocostras, que son comunidades de elementos entrelazados constituidas por organismos poiquilohídricos como cianobacterias, algas verdes, microhongos, bacterias heterótrofas, líquenes, musgos y microartrópodos. Las biocostras están implicadas en la formación, estabilidad y fertilidad de los suelos, pues protegen las superficies desérticas de la erosión del viento y el agua, aumentando la germinación y supervivencia de plantas nativas. Igualmente, las biocostras mejoran el contenido de elementos bioesenciales como carbono, nitrógeno y fósforo. Estos procesos de transformación biótica de ecosistemas incipientes son llevados a cabo en gran parte por determinadas especies bacterianas presentes en las biocostras. Esta investigación tuvo como propósito iniciar la bioprospección de las biocostras presentes en el ecosistema en formación en el frente del glaciar del Humboldt. Para ello se aislaron 35 cepas bacterianas psicrófilas y psicotolerantes (a 5°C) potencialmente promotoras del crecimiento vegetal. La identificación molecular realizada indica que 28 de las 35 cepas aisladas pertenecen a siete géneros diferentes, *Arthrobacter*, *Cryobacterium*, *Frondehabitans*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* y *Sphingomonas*, *Paenarthrobacter*, pero su identificación específica queda por resolverse. La exploración *in silico* de las funciones ecológicas potenciales de dichas cepas indica que estos diferentes géneros parecen estar involucrados en el ciclaje de nitrógeno, mineralización y solubilización de fósforo, síntesis de sideróforos y síntesis o regulación de hormonas vegetales (auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno). El género *Pseudomonas* es el que muestra una mayor versatilidad metabólica relacionada con diversas funciones ecológicas y aplicaciones biotecnológicas relevantes.

Palabras claves: biocostras, bacterias, aislamiento, sucesión primaria, promoción del crecimiento vegetal, metabolismo de bioelementos.

Índice de contenido

INTRODUCCIÓN	13
MARCO TEÓRICO	16
Glaciares y microbiota glacial	16
Sucesión primaria	18
Biocostras y su función	19
Bacterias presentes en las biocostras	21
Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB)	21
El fósforo	23
Ciclo del fósforo	23
Mecanismos bacterianos para el ciclaje del fósforo	24
Disolución o solubilización	24
Mineralización	25
Genes funcionales de la ruta del fósforo	27
El nitrógeno	27
Ciclo del nitrógeno	28
Genes funcionales de la ruta del nitrógeno	29
Fijación de nitrógeno	29
Nitrificación.....	30
Desnitrificación	30
Anammox	32
Sideróforos	32
Hidroxiatos	33
Catecolatos	33
Carboxilatos.....	33
Producción de fitohormonas	33
Auxinas	34
Vía del ácido indol-3-acético (AIA)	34
Vía del indol-3-piruvato (IPA)	35
Vía indol-3-acetamida (IAM).....	36
Vía del indolacetaldoxima (IAOx)	36
Vía del indolacetaldehído (IAH)	36
Vía de la triptamina.....	36
Citoquininas	37
Giberelinas	38
Etileno	40
HIPÓTESIS	42

OBJETIVOS	43
Objetivo general	43
Objetivos específicos.....	43
METODOLOGÍA	44
Muestreo de biocostras	44
Aislamiento y caracterización cultural de las cepas bacterianas	45
Identificación molecular de las cepas bacterianas.....	46
Caracterización bioquímica <i>in silico</i> de las cepas bacterianas.....	47
RESULTADOS	48
Aislamiento de cepas bacterianas presentes en las biocostras y caracterización cultural	48
Identificación de las cepas con el marcador molecular <i>ARNr 16S</i>	51
Identificación <i>in silico</i> de genes funcionales de la ruta del fósforo en los géneros estudiados	56
Solubilización de fósforo inorgánico	56
Mineralización de fósforo orgánico.....	58
Identificación <i>in silico</i> de genes funcionales de la ruta del nitrógeno en los géneros estudiados	60
Identificación <i>in silico</i> de genes implicados en la síntesis de sideróforos en los géneros estudiados	63
Identificación <i>in silico</i> de genes implicados en la síntesis de fitohormonas en los géneros estudiados.....	65
Biosíntesis de ácido indol-3-acético (AIA).....	65
Vía del ácido pirúvico	65
Vía de la indol-3-acetamida	65
Vía de la indolacetaldoxima	66
Vía del indolacetaldehído.....	67
Vía de la triptamina.....	67
Citoquinina	69
Giberelinas	71
Etileno	73
DISCUSIÓN	80
Aislamiento de las cepas bacterianas	80
Identificación de las cepas	81
Identificación <i>in silico</i> de genes funcionales.....	87
Fósforo	87
Solubilización de fósforo	87
Mineralización de fósforo	89
Nitrógeno	73

Fijación de nitrógeno	73
Nitrificación.....	75
Desnitrificación	76
Anammox	77
Sideróforos	91
Síntesis de fitohormonas	93
Ruta de síntesis del ácido indol-3-acético	93
Giberelinas.....	94
Citoquininas.....	95
Etileno	96
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	98
Conclusiones	98
Perspectivas	99
REFERENCIAS	101
ANEXOS.....	114

www.bdigital.ula.ve

Índice de tablas

Tabla 1. Proporción de reactivos en la mezcla de reacción para las PCRs.....	46
Tabla 2. Caracterización cultural de las cepas aisladas a partir de las biocostras a 5°C. .	48
Tabla 3. Identificación a nivel de género y especie de las cepas aisladas de la biocostra. Se muestran los géneros bacterianos a los que pertenece cada cepa y las dos primeras especies encontradas en el BLAST. Para cada una se muestra el porcentaje de identidad.....	51
Tabla 4. Presencia (1) o ausencia (0) de los genes involucrados en la síntesis de ácido gluconico para cada uno de los géneros estudiados. Se muestran los sustratos utilizados por cada una de las enzimas codificadas por dichos genes y sus productos. Los nombres de los géneros se resumen así: A= <i>Arthrobacter</i> , S= <i>Sphingomonas</i> , F= <i>Fronidhabitans</i> , C= <i>Cryobacterium</i> , R= <i>Rhodococcus</i> , Ps= <i>Pseudomonas</i>	57
Tabla 5. Presencia (1) o ausencia (0) de los genes involucrados en la mineralización de fósforo. Se muestran los sustratos utilizados por cada una de las enzimas codificadas por dichos genes y sus productos. Los nombres de los géneros se resumen así: A= <i>Arthrobacter</i> , S= <i>Sphingomonas</i> , F= <i>Fronidhabitans</i> , C= <i>Cryobacterium</i> , R= <i>Rhodococcus</i> , Ps= <i>Pseudomonas</i>	58
Tabla 6. Presencia (1) o ausencia (0) de los genes involucrados en el transporte de fosfato en bacterias para cada uno de los géneros estudiados. Se muestran los sustratos utilizados por cada una de las enzimas codificadas por dichos genes y sus productos. Los nombres de los géneros se resumen así: A= <i>Arthrobacter</i> , S= <i>Sphingomonas</i> , F= <i>Fronidhabitans</i> , C= <i>Cryobacterium</i> , R= <i>Rhodococcus</i> , Ps= <i>Pseudomonas</i>	59
Tabla 7. Géneros bacterianos capaces de completar (sí) o no (no) los procesos de solubilización y mineralización. Los nombres de los géneros se resumen así: A= <i>Arthrobacter</i> , S= <i>Sphingomonas</i> , F= <i>Fronidhabitans</i> , C= <i>Cryobacterium</i> , R= <i>Rhodococcus</i> , Ps= <i>Pseudomonas</i>	59
Tabla 8. Presencia (1) o ausencia (0) de los genes de las principales vías metabólicas de la ruta del nitrógeno por género bacteriano aislado a partir de biocostras. Se muestran los genes implicados en cada una de las subrutas del nitrógeno para cada uno de los géneros estudiados. Los nombres de los géneros se resumen así: A= <i>Arthrobacter</i> , S= <i>Sphingomonas</i> , F= <i>Fronidhabitans</i> , C= <i>Cryobacterium</i> , R= <i>Rhodococcus</i> , Ps= <i>Pseudomonas</i>	60
Tabla 9. Géneros bacterianos capaces de completar (sí) o no (no) las diferentes subrutas del nitrógeno. Los nombres de los géneros se resumen así: A= <i>Arthrobacter</i> , S= <i>Sphingomonas</i> , F= <i>Fronidhabitans</i> , C= <i>Cryobacterium</i> , R= <i>Rhodococcus</i> , Ps= <i>Pseudomonas</i>	63
Tabla 10. Géneros bacterianos capaces de completar (sí) o no (no) la biosíntesis de los diferentes sideróforos estudiados. Los nombres de los géneros se resumen así: A= <i>Arthrobacter</i> , S= <i>Sphingomonas</i> , F= <i>Fronidhabitans</i> , C= <i>Cryobacterium</i> , R= <i>Rhodococcus</i> , Ps= <i>Pseudomonas</i>	64
Tabla 11. Presencia (1) o ausencia (0) de los genes involucrados en la vía del ácido pirúvico en cada uno de los géneros estudiados. Se muestran además los sustratos utilizados por cada una de las enzimas codificadas por dichos genes, y sus productos. Los nombres de los géneros	

se resumen así: A=*Arthrobacter*, S=*Sphingomonas*, F=*Fronidhabitans*, C=*Cryobacterium*, R=*Rhodococcus*, Ps=*Pseudomonas*.65

Tabla 12. Presencia (1) o ausencia (0) de los genes involucrados en la vía de la indol-3-acetamida en cada uno de los géneros estudiados. Se muestran los sustratos utilizados por cada una de las enzimas codificadas por dichos genes, y sus productos. Los nombres de los géneros se resumen así: A=*Arthrobacter*, S=*Sphingomonas*, F=*Fronidhabitans*, C=*Cryobacterium*, R=*Rhodococcus*, Ps=*Pseudomonas*.66

Tabla 13. Presencia (1) o ausencia (0) de los genes involucrados en la vía de la indolacetaldoxima en cada uno de los géneros estudiados. Se muestran además los sustratos utilizados por cada una de las enzimas codificadas por dichos genes y sus productos. Los nombres de los géneros se resumen así: A=*Arthrobacter*, S=*Sphingomonas*, F=*Fronidhabitans*, C=*Cryobacterium*, R=*Rhodococcus*, Ps=*Pseudomonas*.66

Tabla 14. Presencia (1) o ausencia (0) de los genes involucrados en la vía de la indolacetaldehído en cada uno de los géneros estudiados. Se muestran además los sustratos utilizados por cada una de las enzimas codificadas por dichos genes y sus productos. Los nombres de los géneros se resumen así: A=*Arthrobacter*, S=*Sphingomonas*, F=*Fronidhabitans*, C=*Cryobacterium*, R=*Rhodococcus*, Ps=*Pseudomonas*.67

Tabla 15. Presencia (1) o ausencia (0) de los genes involucrados en la vía de la triptamina para cada uno de los géneros estudiados. Se muestran los sustratos utilizados por cada una de las enzimas codificadas por dichos genes y sus productos. Los nombres de los géneros se resumen así: A=*Arthrobacter*, S=*Sphingomonas*, F=*Fronidhabitans*, C=*Cryobacterium*, R=*Rhodococcus*, Ps=*Pseudomonas*.68

Tabla 16. Géneros bacterianos capaces de completar (sí) o no (no) las diferentes subrutas de síntesis del AIA. Los nombres de los géneros se resumen así: A=*Arthrobacter*, S=*Sphingomonas*, F=*Fronidhabitans*, C=*Cryobacterium*, R=*Rhodococcus*, Ps=*Pseudomonas*.68

Tabla 17. Presencia (1) o ausencia (0) de los genes involucrados en la síntesis de zeatina en bacterias para cada uno de los géneros estudiados. Se muestran los sustratos utilizados por cada una de las enzimas codificadas por dichos genes y sus productos. Los nombres de los géneros se resumen así: A=*Arthrobacter*, S=*Sphingomonas*, F=*Fronidhabitans*, C=*Cryobacterium*, R=*Rhodococcus*, Ps=*Pseudomonas*.70

Tabla 18. Géneros bacterianos capaces de completar (sí) o no (no) la biosíntesis de zeatina. Los nombres de los géneros se resumen así: A=*Arthrobacter*, S=*Sphingomonas*, F=*Fronidhabitans*, C=*Cryobacterium*, R=*Rhodococcus*, Ps=*Pseudomonas*.71

Tabla 19. Géneros bacterianos capaces de completar (sí) o no (no) la biosíntesis de giberelinas. Los nombres de los géneros se resumen así: A=*Arthrobacter*, S=*Sphingomonas*, F=*Fronidhabitans*, C=*Cryobacterium*, R=*Rhodococcus*, Ps=*Pseudomonas*.72

Tabla 20. Géneros bacterianos capaces de completar (sí) o no (no) la biosíntesis de giberelinas. Los nombres de los géneros se resumen así: A=*Arthrobacter*, S=*Sphingomonas*, F=*Fronidhabitans*, C=*Cryobacterium*, R=*Rhodococcus*, Ps=*Pseudomonas*.72

Tabla 21. Presencia (1) o ausencia (0) de los genes involucrados en la síntesis de etileno en bacterias para cada uno de los géneros estudiados. Se muestran los sustratos utilizados por cada

una de las enzimas codificadas por dichos genes y sus productos. Los nombres de los géneros se resumen así: A=*Arthrobacter*, S=*Sphingomonas*, F=*Fronidhabitans*, C=*Cryobacterium*, R=*Rhodococcus*, Ps=*Pseudomonas*.78

Tabla 22. Géneros bacterianos capaces de completar (sí) o no (no) la biosíntesis de etileno y su regulación. Los nombres de los géneros se resumen así: A=*Arthrobacter*, S=*Sphingomonas*, F=*Fronidhabitans*, C=*Cryobacterium*, R=*Rhodococcus*, Ps=*Pseudomonas*.79

www.bdigital.ula.ve

Índice de figuras

- Figura 1.** Biocostras presentes en la transecta del año 2009 del Pico Humboldt. Son visibles algunos organismos macroscópicos como musgos (verdes, en círculos negros) y líquenes (puntos blancos y rosados, en círculos blancos). Fuente propia.20
- Figura 2.** Ciclo general del fósforo. Se muestran los procesos de disolución y mineralización. En círculos y letra cursiva se indican los genes bacterianos involucrados en cada proceso. Figura recopilada a partir de varios artículos citados en el texto.....24
- Figura 3.** Ciclo del nitrógeno. Se muestra cada subruta del ciclo global del nitrógeno y en la periferia de las flechas, los genes bacterianos más importantes involucrados en cada proceso. Figura reconstruida a partir de varias fuentes citadas en el texto29
- Figura 4.** Estructura química del ácido indol-3-acético (AIA). Fuente: Azcón & Talón (2013).35
- Figura 5.** Estructura química de la zeatina. Fuente: Azcón & Talón (2013).38
- Figura 6.** Estructura química de las cuatro giberelinas sintetizadas por bacterias. Figura modificada de Olanrewaju et al. (2017).39
- Figura 7.** Estructura química del etileno. Fuente: Azcón & Talón (2013).40
- Figura 8.** Área de estudio. Panel de la izquierda: ubicación geográfica de Venezuela. Panel de la derecha: mapa del estado Mérida donde se muestra la ubicación del Parque Nacional Sierra Nevada y del pico Humboldt. Figura modificada de Llambí et al. (2021).44
- Figura 9.** Vista general de la cara noroeste de los picos Humboldt y Bonpland. Se indica la ubicación de las transectas y la cobertura glacial en diferentes momentos entre los años 1910 y 2019. Figura tomada de Llambí et al., (2021).45
- Figura 10.** Posición filogenética de las cepas aisladas mediante análisis del gen ARNr 16S. Se muestra un árbol radial, y se realzan con pequeños cuadrados azules los nodos de las cepas estudiadas en el presente estudio, con sus nombres en negrita. En el círculo externo se muestra la identificación a nivel de género.54
- Figura 11.** Polimorfismos puntuales presentes en las secuencias estudiadas. Se muestran los polimorfismos puntuales encontrados en las secuencias obtenidas para el gen 16S por género estudiado. En la parte superior se indica la posición del nucleótido correspondiente y a la izquierda el nombre de la cepa a la que pertenece dicha secuencia. Las letras presentes en los recuadros indican los nucleótidos correspondientes por secuencia. A= adenina, C=citosina, G=guanina y T= timina. Los recuadros blancos corresponden a regiones donde no hay más nucleótidos en la secuencia, los que tienen un signo de interrogación corresponden a dobles picos (dos nucleótidos diferentes en una misma posición) y los que presentan una línea horizontal, a deleciones56
- Figura 12.** Participación de los géneros estudiados en la solubilización de fósforo. Los círculos negros indican los sustratos y productos de las subreacciones, las flechas negras indican el sentido de la reacción y los números representan el(los) género(s) que poseen los genes para completar la reacción.58
- Figura 13.** Participación de los géneros estudiados en la mineralización de fósforo. Los círculos negros indican los sustratos y productos de las subreacciones, las flechas negras indican

el sentido de la reacción y los números representan el(los) género(s) que poseen los genes para completar la reacción.60

Figura 14. Participación de los géneros estudiados en el ciclo global del nitrógeno. Los círculos negros indican los sustratos y productos de las subreacciones, las flechas negras indican el sentido de la reacción y los números representan el(los) género(s) que poseen los genes para completar la reacción.62

Figura 15. Participación de los géneros estudiados en la síntesis de sideróforos. Los círculos negros indican los sustratos y productos de las subreacciones, las flechas negras indican el sentido de la reacción y los números representan el(los) género(s) que poseen los genes para completar la reacción.64

Figura 16. Participación de los géneros estudiados en la síntesis de ácido indol-3-acético (indol-3-acetato). Los círculos negros indican los sustratos y productos de las subreacciones, las flechas negras indican el sentido de la reacción y los números.....69

Figura 17. Participación de los géneros estudiados en la síntesis de zeatina. Los círculos negros indican los sustratos y productos de las subreacciones, las flechas negras indican el sentido de la reacción y los números representan el(los) género(s) que poseen los genes para completar la reacción.71

Figura 18. Participación de los géneros estudiados en la síntesis de giberelinas. Los círculos negros indican los sustratos y productos de las subreacciones, las flechas negras indican el sentido de la reacción y los números representan el(los) género(s) que poseen los genes para completar la reacción.73

Figura 19. Participación de los géneros estudiados en la síntesis y degradación de etileno. Los círculos negros indican los sustratos y productos de las subreacciones, las flechas negras indican el sentido de la reacción y los números representan el(los) género(s) que poseen los genes para completar la reacción.79

Introducción

De las principales zonas de la superficie terrestre, una de las más afectadas por los procesos antropológicos es la criósfera, cuyas masas de hielo incluyen una gran variedad de ecosistemas, desde océanos, glaciares de agua dulce, capas de hielo, cubiertas de nieve y permafrost. Según Magallanes (2014), los glaciares son cuerpos de agua en forma de hielo, donde se puede encontrar más del 65% del agua dulce del mundo, siendo por esa razón responsables de una gran variedad de eventos climáticos presentes en la Tierra desde hace millones de años.

Desde el momento en el que Abyzov y colaboradores encontraron células microbianas viables dentro del hielo antártico (Abyzov et al., 1982), cientos de estudios han registrado que estos cuerpos de agua congelados son el hábitat de microorganismos en constante desarrollo y evolución, aún en las condiciones extremas que presentan. Según Miteva (2008) el hielo de los glaciares es un ecosistema único que preserva la vida microbiana y el cambio cronológico del clima durante cientos de miles de años. De hecho, dada la singularidad de estos ambientes y la alta diversidad microbiana que albergan, los glaciares han sido considerados un bioma en sí mismos (Anesio & Laybourn-Parry, 2012). En estos ambientes fríos y de gran altitud (en el caso de los glaciares de montaña) hay evidencia de que las bacterias y los microorganismos en general proliferan, incluso, en gotas de nubes sobreenfriadas cerca del hielo glaciar (Sattler et al., 2001), usando ácidos orgánicos y alcoholes para el crecimiento. Por lo tanto, la desaparición de estas masas de hielo afecta de forma directa la diversidad de especies microbianas de todo el planeta, y por lo tanto, el funcionamiento de los ecosistemas.

Debe señalarse que el cambio climático y en particular el aumento de la temperatura global, está provocando el retroceso de los glaciares a nivel mundial. Desde 1990, la reducción de los glaciares alpinos ha sido dramática, con ritmos anuales de desaparición muy acelerados. A nivel mundial, la tasa de pérdida de masa de hielo entre 1996 y 2005 es el doble de la registrada entre 1986 y 1995, y cuatro veces superior a la tasa entre 1976 y 1985 (Zemp et al., 2008). De continuar a este ritmo la deglaciación, a finales del siglo XXI es muy probable que haya desaparecido buena parte de los glaciares actuales, empezando por aquellos situados en zonas cálidas, como el sur de Europa, África, Asia tropical y América del Sur.

Según Salamanca (2011) también en los Andes se acusa una regresión acelerada de los glaciares. Un caso dramático es el del nevado Pastoruri, en la Cordillera Blanca de Perú, cuyo glaciar podría desaparecer en pocas décadas. Igualmente, la mayoría de los glaciares de la Patagonia Argentina y Chilena, incluyendo el Hielo Patagónico, ha retrocedido de forma considerable en el último medio siglo. El retroceso de los glaciares ha sido un reflejo de los cambios en el clima de los Andes tropicales en los últimos 50 a 60 años. La temperatura en los Andes ha aumentado aproximadamente 0,1 °C/década, con sólo dos de los años entre 1961–90 por debajo del promedio (Vuille et al., 2015).

Tras el incremento acelerado de las temperaturas, Venezuela podría ser el primer país del mundo en quedarse sin glaciares, si esa lamentable carrera no es ganada por Uganda, Kenia o Indonesia. El glaciar del pico Humboldt es el último relicto del hielo glaciar en el país. El pico

Humboldt es el segundo pico más alto de Venezuela, con 4.940 m.s.n.m. y, se encuentra en el Parque Nacional Sierra Nevada, en Mérida, sobre la Cordillera de los Andes. Varios estudios han descrito la dinámica del glaciar del Humboldt a lo largo del último siglo (Carrillo & Yépez, 2010; Ramírez et al., 2020). Carrillo & Yépez (2010) estimaron un 84% de pérdida de masa glacial en los 50 años precedentes al estudio, y una tasa de retroceso de 31,4 m²/año. En el momento de dicho estudio, la superficie del glaciar era de tan sólo 0,240 km². Sin embargo, diez años más tarde, el glaciar del Humboldt se había reducido a 0,046 km² (Ramírez et al., 2020), y las mediciones más recientes (llevadas a cabo en marzo de 2022, con fotos de drone por parte del personal de INPARQUES), indican que sólo quedan 0,021 km² de masa glacial (datos no publicados).

Al retirarse el Glaciar del Humboldt, está dejando a su paso un paisaje de roca desnuda que está siendo colonizada por una gran variedad de especies. Según Clements (1916), cuando se desarrolla un ecosistema nuevo en superficies desnudas, como la roca generada por el deshielo, donde disturbios severos han removido la mayoría o toda la actividad biológica, se genera un proceso de sucesión primaria. Sobre la roca desnuda descubierta por el deshielo se establecen especies particulares. Según Llambí et al. (2021), el proceso sucesional en el frente glacial del Humboldt inicia con el establecimiento de líquenes y briófitos (como organismos fotosintéticos pioneros) que mejoran las condiciones locales dentro de las costras biológicas (amortiguación de las fluctuaciones de temperatura superficial del suelo) facilitando la colonización ruderal de plantas vasculares.

Una de las comunidades más representativas de estos procesos sucesionales en regiones desérticas frías, son las costras biológicas (o biocostras, como se denominarán de ahora en adelante), que son “comunidades de elementos entrelazados constituidos por organismos poiquilohídricos, como cianobacterias, algas verdes, microhongos, bacterias, líquenes, musgos y microartrópodos” (Machado, 2020). Según Belnap (2003), las biocostras ocurren sobre la superficie de diferentes regiones como comunidades sucesionales efímeras. Una gran evidencia científica indica que las biocostras facilitan la sucesión o establecimiento de organismos posteriores (Bowker, 2007).

Los pequeños organismos presentes en las biocostras son sorprendentemente importantes para muchos procesos en ecosistemas desérticos pasados y presentes (Belnap, 2003), pues se ha registrado que estas comunidades están implicadas en los procesos de fijación de nitrógeno (Belnap, 2001) y carbono (Machado, 2020), en la infiltración de agua y fertilidad de suelos en regiones desérticas (Brotherson et al., 1983) y en el establecimiento de especies de plantas vasculares (Godínez-Álvarez et al., 2012).

Las biocostras influyen sobre la microtopografía de las superficies del suelo, actuando como componentes esenciales para la captura de semillas transportadas por el viento y el agua (Godínez-Álvarez et al., 2012). Según Belnap (2001), la presencia de biocostras del suelo puede aumentar la temperatura de la superficie hasta en 14 °C, lo cual afecta directamente la germinación de las semillas, el crecimiento de las plantas y las tasas de absorción de nutrientes.

La presencia de biocostras puede alterar significativamente el pH del suelo, la cantidad y disponibilidad de nutrientes esenciales para las plantas y el contenido de materia orgánica. Según Belnap (2001), “los diversos estudios en desiertos fríos muestran que las biocostras mejoran el contenido de la mayoría de los elementos bioesenciales, como nitrógeno, potasio, calcio, magnesio, fósforo, hierro, manganeso, cloro y azufre”. Una de las principales razones de eso es la presencia de determinadas especies bacterianas (incluidas cianobacterias) en las biocostras, quienes poseen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, y solubilizar y mineralizar el fósforo, haciendo que estos nutrientes esenciales estén disponibles en el suelo para su captura y utilización por parte de las plantas. Igualmente, debido a que muchos de estos organismos son autótrofos, las biocostras tienen un papel esencial en la fijación de carbono y su incorporación a la cadena trófica. De hecho, se ha estimado que el 6-7% del carbono fijado durante la fotosíntesis anualmente en la superficie terrestre es asimilado por cianobacterias que forman parte de biocostras (Belnap., 2001).

La función de las biocostras en los ecosistemas fríos del planeta ha suscitado gran interés en la investigación científica, reconociendo su papel como posibles pioneras en la sucesión temprana de glaciares en retroceso (Chapin et al., 1994). En la sucesión primaria del frente glacial del Pico Humboldt, las biocostras también parecen estar actuando como “ingenieros ecosistémicos” (Llambí et al., 2021). No cabe duda sobre el rol determinante de los microorganismos de las biocostras en la transformación y enriquecimiento del suelo en formación en un ecosistema incipiente como el que se está ensamblando en dicho frente glacial. En este contexto, el presente proyecto tiene como propósito estudiar las bacterias presentes en las biocostras del frente glacial del pico Humboldt. En particular, se aislaron e identificaron dichas bacterias y se exploró su posible papel ecológico y como consecuencia, su rol potencial como promotoras del crecimiento vegetal.

De esta manera, utilizando como modelo de estudio las bacterias psicrófilas y psicrotolerantes presentes en las biocostras del pico Humboldt, se plantean las siguientes interrogantes generales:

- ¿Qué especies de bacterias cultivables son abundantes en las biocostras del frente glacial de un glaciar tropical?
- ¿Juegan estas bacterias un rol potencial en la promoción del crecimiento de especies vegetales que forman parte de la sucesión primaria, dada su participación en las principales rutas metabólicas que otorgan nitrógeno y fósforo al suelo, y en otras rutas metabólicas importantes?
- ¿Son estos diferentes grupos bacterianos componentes principales de una intrincada red metabólica de interacción del suelo?
- ¿De qué maneras diversas permiten estas bacterias el establecimiento de nuevos organismos colonizadores en los procesos sucesionales primarios?

Marco teórico

Glaciares y microbiota glacial

Los glaciares son masas de hielo que crecen como producto de la acumulación, compactación y recristalización de la nieve. Según Toro et al. (2008), éstos se forman debido a la acumulación gradual del hielo que cae sobre ellos a lo largo del tiempo. Cuando las nevadas del invierno superan la pérdida de nieve en el verano debido a la evaporación y derretimiento, una nueva capa de nieve se agrega a la superficie del glaciar. Esta nieve de la superficie se derrite y se vuelve a congelar en los días cálidos y las noches frías, lo que permite compactar la nieve y convertirla en hielo granular, al que se le llama “firn”. Este hielo intermedio luego se comprime sobre un período de 25 a 100 años en hielo glacial duro y cristalino por el peso de las capas superiores (Strahler, 1970). Cuando la masa de hielo se vuelve tan espesa que comienza a moverse bajo la fuerza de la gravedad, el glaciar se desplaza hacia abajo encontrando menos nevadas y temperaturas más cálidas a menor altitud, lo que provoca la pérdida de hielo y el derretimiento del glaciar. De esta manera, un glaciar es un sistema abierto que mantiene un equilibrio dinámico entre la entrada de nieve acumulada y la salida de la nieve que se derrite o se evapora (Strahler, 1970).

La Cordillera de los Andes, ubicada al oeste de Venezuela, cubre más de 400 Km del territorio nacional. La Sierra Nevada constituye un fragmento de la Cordillera de los Andes, y se encuentra ubicada al norte de ésta (Carrillo & Yépez, 2010). La Sierra Nevada se localiza entre las coordenadas 7°30' a 10°10' Norte, 69°20' a 72°50' Oeste, y en ella se encuentra uno de los relieves montañosos más importantes del país (Toro et al., 2008). Sobre esta Sierra, resaltan el Pico Bolívar (4.980 m), Pico Humboldt (4.942 m), Pico Bonpland (4.883 m), Pico La Concha (4870 m), Pico Toro. (4758 m) y Pico León (4720 m). Estos picos se encontraban cubiertos por nieves perpetuas hace más de 50 años, constituyendo regiones montañosas donde estuvieron establecidos glaciares importantes, de amplia extensión.

El glaciar del Humboldt forma parte de lo que se conoce, en Venezuela, como Glaciar del Sinigüis, descrito por Janh en 1925. El glaciar del Sinigüis es un casquete de hielo ubicado entre los picos Humboldt y Bonpland. El Pico Humboldt (8°33'0.8" N, 71°59'50.6" O), es el pico que posee el último glaciar de Venezuela (Ramírez et al., 2020). La zona que constituye el Pico Bonpland ha perdido, en la actualidad, todo su hielo glaciar.

Según Ball et al. (2013), en la actualidad, los glaciares tropicales (como el glaciar del pico Humboldt) se han visto afectados de manera directa por las perturbaciones climáticas, por lo que muchos de ellos se encuentran entre los glaciares en retroceso más rápido de toda la región andina. Con esta tendencia, los glaciares de los Andes venezolanos (actualmente sólo permanece el glaciar del Pico Humboldt) se cree que desaparecerán totalmente en poco tiempo (Ramírez, et al., 2020). Este proceso de retroceso puede ser explicado por diferentes factores que relacionan de manera directa al cambio climático y a la estructura física del Pico Humboldt.

En cuanto al cambio climático global, se sabe que la acción del efecto invernadero y la presencia de períodos anuales secos en esta región andina pueden ser los principales factores

relacionados con el retroceso de este hielo glaciar. Sin embargo, Magallanes (2014) sugiere que este glaciar ha prevalecido en el tiempo debido a factores topográficos entre los que destacan ciertas anomalías del propio Pico Humboldt, tales como:

Mayor flujo de nieve a través del lomo entre los picos Humboldt y Bonpland, lo que permite una mayor acumulación de nieve en las laderas orientadas al noreste y no en la parte superior, como es lo común en otros glaciares tropicales, permitiendo mantener estable lo que aún queda del área del glaciar.

La presencia de nubes que tienden a proteger las laderas del glaciar de la radiación solar por la tarde en el norte y oeste de la Sierra Nevada de Mérida. La otra parte del glaciar que queda desprotegida, encuentra sombra gracias a las crestas rocosas circundantes.

Finalmente, la presencia del collado existente entre los picos Humboldt y Bonpland. Este collado es lo suficientemente grande para permitir la gran acumulación de nieve necesaria para la formación y mantenimiento del glaciar.

Desde hace algunas décadas, se ha registrado que los glaciares, como el glaciar del Humboldt, son depósitos de formas microbianas. Los microorganismos presentes en ellos llegan a su superficie asociados a pequeñas partículas de polvo impulsadas por el viento, en algunos casos luego de viajar largas distancias, desde ecosistemas lejanos (Priscu et al., 2007). Christner et al. (2000) fueron los primeros en descubrir que los glaciares de todo el mundo han sido colonizados por microorganismos desde hace millones de años. Muchas de estas especies microbianas colonizadoras de estos ambientes, pueden permanecer con vida hasta la actualidad. Sin embargo, algunos de estos microorganismos han evolucionado *in situ* y se han adaptado a las condiciones predominantemente agrestes de este entorno (Bidle et al., 2007).

Lo que queda del glaciar del Pico Humboldt es considerado como un hábitat microbiano frío. En 2013, Ball y colaboradores aislaron, identificaron y caracterizaron 45 cepas bacterianas del hielo glaciar del Pico Humboldt, siendo ese el primer reporte de microorganismos del hielo glaciar en los Andes.

Según Rondón et al. (2016), que estudiaron las bacterias presentes en el hielo glaciar del Pico Bolívar, los ambientes glaciares tropicales albergan una abundante comunidad bacteriana, consistente principalmente de microorganismos “psicrotolerantes”, también llamados “psicrotóxicos” (Morita 1975) o “euripsicrofílicos”, y “psicrofílicos” (Morita 1975; o “estenopsicrofílicos”), muchos de los cuales enfrentan la extinción total considerando el rápido derretimiento de estos ambientes. Morita (1975) introdujo el término “psicrofílicos” (amantes del frío) para referirse a aquellos microorganismos cuyas temperaturas de crecimiento (mínimo, óptimo y máximo) son iguales o menores que 0, 15 y 20 °C, respectivamente. En cambio, los organismos ahora llamados “psicrotolerantes” (resistentes al frío) presentan temperaturas óptimas y máximas mayores a esos valores (Helmke & Weyland 2004).

Yarzabal (2021) indica que los microbios aislados del hielo de glaciares andinos son a menudo psicrófilos ya que pueden crecer de manera óptima a bajas temperaturas. Los

microorganismos psicrófilos no sólo se mantienen metabólicamente activos, sino que también se dividen a bajas temperaturas. Esta habilidad ha evolucionado a través de una serie de adaptaciones, tanto moleculares como fisiológicas, que les permite hacer frente a las duras condiciones impuestas. Los microorganismos presentes en el hielo glaciar pueden abarcar una gran diversidad de especies bacterianas psicrófilas que además de soportar bajas temperaturas, también toleran altas presiones hidrostáticas y osmóticas, muy baja disponibilidad de nutrientes y elevadas dosis de radiaciones cósmicas, solares y terrestres (Ball et al., 2013).

Las bacterias psicrófilas aisladas del hielo glaciar de los glaciares venezolanos poseen funciones ecosistémicas importantes, como la promoción del crecimiento vegetal, ya que promueven la disolución de fósforo inorgánico a bajas temperaturas, tienen la capacidad de producir fitohormonas, excretan sideróforos e inhiben fitopatógenos (Rondón et al., 2019, Balcázar et al., 2015). En otro estudio pionero de este tipo, Tapia et al. (2019) llevaron a cabo el aislamiento de microorganismos psicrófilos y psicotolerantes promotores del crecimiento de plantas en otro hábitat frío. Los autores encontraron, igualmente, que las bacterias aisladas producían ácido indolacético, enzimas hidrolíticas (celulasas, xilanasas y quitinasas) y sideróforos, y eran capaces de solubilizar fosfato inorgánico; estos atributos metabólicos promueven el crecimiento de las plantas a las cuales se encuentran asociadas.

Sucesión primaria

La dinámica de los ecosistemas en el tiempo, como producto de un disturbio, incluye dos tipos de sucesiones ecológicas, la sucesión primaria y la secundaria. La sucesión primaria se refiere al patrón temporal de cambio de las comunidades de organismos de un ecosistema que se produce tras la colonización de un sustrato de nueva formación que no haya sido previamente modificado por ningún organismo de manera significativa. Este proceso se da, por ejemplo, en las áreas cubiertas por erupciones volcánicas o en los terrenos que quedan descubiertos tras la desaparición de una capa de hielo por retroceso de un glaciar (Fernández, 2016). De esta manera, tras la desaparición del hielo glaciar que cubre el Pico Humboldt, ocurre sobre la roca desnuda un proceso de sucesión primaria (Llambí et al., 2021).

De manera muy similar a lo ocurrido en el frente de dos glaciares de la Tierra de Fuego (Chile) en un escenario de sucesión primaria (Fernández, 2016), los primeros organismos que colonizan el frente glaciar del Pico Humboldt son los microorganismos, los líquenes y los musgos, los cuales contribuyen de manera importante a la formación del suelo (Llambí et al., 2021). Estas formas de vida, seguidas de hongos e incluso hierbas dan lugar a formaciones vegetales más complejas. En el escenario de la sucesión primaria antes mencionada, en Tierra de Fuego, el proceso parte de etapas iniciales que presentan una composición taxonómica de bacterias, hongos y algas, caracterizada por la presencia de grupos como la clase de bacterias *Cyanobacteria*, la de hongos *Chytridiomycetes* o el orden de algas *Prasiolales* (Fernández, 2016). Según Llambí et al. (2021), que analizaron el desarrollo sucesional del suelo y el ensamblaje de líquenes, briófitos y de comunidades vegetales durante las últimas etapas del retroceso de los glaciares en los altos Andes tropicales, son los líquenes y briófitos los principales organismos fotosintéticos pioneros en estos ecosistemas alpinos tropicales de los Andes del Norte.

De acuerdo con Fernández (2016), los microorganismos de etapas sucesionales iniciales tras la desaparición de los glaciares chilenos antes mencionados podrían estar participando en rutas que incrementan la disponibilidad de nutrientes en el suelo, mientras que, transformaciones con requerimientos más específicos, como la desnitrificación y la metanogénesis, y, posteriormente, la degradación de sustratos orgánicos complejos, parecen tener un papel más relevante en etapas sucesionales intermedias y avanzadas, con abundante colonización vegetal.

El estudio de Fernández (2016) y otros de su tipo (e.g. Zimmer et al., 2014), no conciernen los Andes tropicales. Además, en estos estudios se describe principalmente la dinámica sucesional de las comunidades vegetales. No se encontraron estudios que expliquen la dinámica sucesional a nivel de las comunidades microbianas en glaciares tropicales de los Andes. Es decir, no se sabe cómo cambian tales comunidades a lo largo de la sucesión, cuáles son sus especies constituyentes y cuáles son sus roles específicos.

Biocostras y su función

La capa más superficial de los suelos en desiertos fríos representa uno de los entornos más extremos de la tierra. El término “costra biológica” o “biocostra” hace referencia a comunidades complejas presentes en la superficie del suelo. Estas son comunidades de organismos poiquilohídricos como cianobacterias, bacterias heterótrofas, musgos, líquenes, microhongos y microartrópodos que interactúan entre sí y aportan cohesión a los suelos desérticos (Belnap, 2003).

En regiones desérticas frías, como el Pico Humboldt, los organismos que forman parte de las biocostras (Figura 1) requieren de adaptaciones ecológicas que les permitan sobrevivir frente a condiciones adversas. Entre estas adaptaciones destacan:

- La capacidad de los organismos de la corteza para tolerar la deshidratación extrema, lo cual permite resistir períodos prolongados de radiación intensa y ausencia de agua (Belnap, 2003).
- Para mantener las funciones normales de las membranas celulares, las bacterias y organismos psicrofílos se adaptan cambiando la composición de los ácidos grasos de las membranas celulares (Evans & Lange, 2001).
- Ajuste de las rutas metabólicas, por parte de cianobacterias, algas y plantas, para llevar a cabo la fijación de carbono a altas y bajas temperaturas (Evans & Lange, 2001).
- Presencia, en bacterias, de pigmentos para reflejar y/o absorber la radiación excesiva (Belnap, 2003).



Figura 1. Biocostras presentes en la transecta del año 2009 del Pico Humboldt. Son visibles algunos organismos macroscópicos como musgos (verdes, en círculos negros) y líquenes (puntos blancos y rosados, en círculos blancos). Fuente propia.

Como producto de la interacción de los diferentes organismos presentes en las biocostras, se les atribuyen muchas funciones ecológicas que les permiten participar en la formación, estabilidad y fertilidad de los suelos de regiones desérticas frías (Belnap, 2003). Entre ellas destacamos:

- Permiten la retención de polvo rico en nutrientes (fósforo y nitrógeno), como consecuencia de la presencia de vainas de exopolisacáridos secretados por las bacterias existentes en ellas, favoreciendo la fertilidad de los suelos y la entrada de agua (Belnap, 2003).
- Promueven la meteorización de la roca, producto de una mayor retención de agua (Schwartzman, 1989).
- Incrementan la estabilidad del suelo, que se ve promovida por la presencia de polisacáridos extruidos por los organismos de la corteza, que permiten unificar las partículas en agregados. En las superficies agregadas prevalece la mayoría de la biota del suelo y las transformaciones de nutrientes; además, los agregados aumentan la aireación del suelo, la infiltración y la resistencia a la erosión (Belnap, 2003).
- Originan un aumento de las entradas de carbono y nitrógeno al ecosistema, debido a la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno y cianobacterias. Las biocostras son consideradas una fuente importante de estos elementos en los desiertos donde la cobertura de plantas vasculares es limitada. Gran parte del carbono y nitrógeno fijado por las costras

se libera al mojarse, por lo que los eventos de lluvia aportan pulsos de agua y nutrientes a los suelos del desierto (Evans & Lange, 2001).

- Promueven un aumento de la presencia de plantas vasculares y fertilidad del suelo, ya que aumentan la retención de semillas y materiales orgánicos (Belnap, 2001).

Bacterias presentes en las biocostras

Las bacterias psicrófilas y psicrotolerantes, es decir, aquellas que son capaces de crecer activamente en ambientes permanentemente fríos, están entre los principales organismos presentes en las biocostras establecidas tras la desaparición del Glaciar del Humboldt (Ball et al., 2013). Estas bacterias, además de soportar bajas temperaturas, enfrentan un sinfín de condiciones estresantes dadas las condiciones climáticas de estos ambientes. Ellas están expuestas a altas presiones hidrostáticas y osmóticas, muy baja disponibilidad de nutrientes y elevadas dosis de radiaciones cósmicas, solares y terrestres (Ball et al., 2013) además de fluctuaciones de temperaturas importantes durante el día y la noche.

Muchas de las bacterias de desiertos fríos han desarrollado respuestas fisiológicas que les permiten sobrevivir durante largos períodos de tiempo bajo condiciones extremas. Algunas de estas respuestas a los ambientes fríos incluyen la producción de proteínas anticongelantes y crioprotectores, la modificación de la fluidez de la membrana mediante la síntesis de mayores cantidades de ácidos grasos insaturados, la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) basadas en carbohidratos, y la síntesis de enzimas psicrófilas, entre otras (Ball et al. 2013).

Aunque varios estudios (Machado, 2020; Belnap, 2001) registran como organismos pioneros de las biocostras a las cianobacterias *Microcoleus vaginatus* y *Scytonema spp*, las cianobacterias no son los únicos procariontes presentes en biocostras. Según Maier et al. (2016), en biocostras canadienses los géneros bacterianos *Belnapia*, *Muricoccus* y *Sphingomonas* son predominantes en estas comunidades microbianas. Los grupos de bacterias *Betaproteobacteria*, *Actinobacteria* y *Acidobacteria* también han sido registrados en biocostras de desiertos calientes como el Desierto de Sonora.

A pesar de que algunos estudios registran géneros bacterianos importantes como constituyentes de las biocostras (Machado, 2020), en general existen pocos registros de bacterias presentes en biocostras de desiertos fríos o de sucesiones primarias en frentes glaciales, por lo que se sabe muy poco acerca de los géneros bacterianos heterótrofos presentes en estas biocostras.

Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB)

Los microorganismos presentes en el suelo o en biocostras establecidas en él incluyen organismos fúngicos y bacterianos que pueden cumplir funciones beneficiosas para las plantas. Específicamente, las bacterias presentes en el suelo, bien sean asociadas a biocostras o las que se encuentran alrededor de la rizósfera, pueden favorecer el crecimiento de las plantas y como consecuencia, la productividad vegetal. Estas bacterias se denominan bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria; Olanrewaju et al., 2017).

Las PGPB que colonizan específicamente las raíces de las plantas son conocidas como rizobacterias o PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Según Lopes et al. (2021), éstas tienen efectos benéficos para sus hospedadores. En general, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) otorgan beneficios a las plantas; por ejemplo, modulan la producción de fitohormonas, aumentan la disponibilidad de nutrientes como nitrógeno, fósforo y potasio del suelo y favorecen la resistencia contra patógenos (Lopes et al., 2021).

Las PGPB están representadas por una gran diversidad de especies, entre las cuales se incluyen especies de vida libre (*Pseudomonas spp.*, *Arthrobacter spp.*), otras que forman relaciones simbióticas específicas con las plantas (por ejemplo, *Rhizobia spp.* y *Frankia spp.*, que forman nódulos en las raíces de plantas específicas), endófitos que pueden existir dentro de los tejidos de la planta (Olanrewaju et al., 2017) y cianobacterias (Glick, 2012).

Según Yarzabal (2010), en la rizósfera y el suelo circundante, los microorganismos interactúan con las plantas de varias maneras, por lo que mecánicamente, las PGPB se pueden clasificar en:

- Biofertilizantes: proporcionan nutrientes esenciales para el crecimiento de la planta. Por ejemplo, nitrógeno y fósforo.
- Bioestimulantes: promueven el crecimiento de las plantas mediante la liberación de fitoestimulantes (hormonas vegetales).
- Bioprotectores o biocontroladores: actúan inhibiendo los patógenos de las plantas.

Según Glick (2012), las PGPB pueden intervenir en el desarrollo de las plantas mediante dos mecanismos de acción. Uno de ellos es directo, es decir, facilita la adquisición de recursos o modula los niveles de hormonas vegetales. El otro es indirecto, y disminuye los efectos inhibitorios de varios agentes patógenos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, es decir, actúa como bacterias de control biológico.

Los mecanismos directos son procesos en los que las PGPB proporcionan a las plantas recursos o nutrientes que no están suficientemente disponibles en el suelo, es decir, nutrientes de los que las plantas carecen, promoviendo de manera directa el crecimiento vegetal (Glick, 2012). Según Olanrewaju et al. (2017), los principales nutrientes que las PGPB hacen disponibles para las plantas son el fósforo, nitrógeno y hierro. Estos mecanismos incluyen, además, la producción de fitohormonas como auxinas, citoquinina y giberelina. Adicionalmente, algunos autores indican la síntesis de la enzima ACC desaminasa por parte de las PGPB como un mecanismo directo de promoción de crecimiento vegetal.

Los mecanismos indirectos se refieren a rasgos bacterianos que inhiben el funcionamiento de uno o más organismos fitopatógenos, tanto hongos como bacterias. Los mecanismos indirectos incluyen, según algunos autores, la ACC desaminasa, antibióticos, enzimas que degradan la pared celular, competencia, cianuro de hidrógeno, resistencia sistémica inducida, extinción del quórum y sideróforos (Olanrewaju et al., 2017).

El fósforo

El fósforo (P), al igual que el nitrógeno, es un macronutriente esencial para toda la biota de la Tierra, ya que está implicado en los procesos de bioenergética celular, la formación de bicapas lipídicas y el mantenimiento de estructuras genéticas (Bergkemper et al., 2016).

En ecosistemas naturales fríos, como los páramos andinos y altiandinos, el P es un factor limitante para el crecimiento de las plantas (Frkova et al., 2022). Es por ello que su presencia es sumamente importante en los procesos sucesionales en estas zonas. Aunque muchos suelos contienen grandes reservas de P total, la biodisponibilidad del ortofosfato soluble, que puede ser utilizado por la mayoría de la biota, es baja (Bergkemper et al., 2016). En consecuencia, se considera que el P es el más inaccesible y no disponible de todos los nutrientes del suelo. Por lo tanto, se ha aceptado generalmente el papel prominente de los microorganismos en la renovación del fósforo del suelo, ya que podrían aumentar la disponibilidad de éste por diferentes medios, lo que conduce a una mejor nutrición de P de las plantas y demás niveles tróficos de los ecosistemas (Yarzabal, 2021).

Ciclo del fósforo

La biodisponibilidad del fósforo para las plantas depende, en cierta medida, de la recirculación de este elemento en la Tierra. Para conocer el papel de las PGPB en hacer disponible este elemento es necesario entender el ciclo del fósforo (Figura 2). Según Mullen (2019), en la Tierra, el mayor reservorio de P son las rocas. Esta reserva de formas inorgánicas de P sirve como fuente de ortofosfatos para las plantas y los microorganismos del suelo. Alternativamente, las fuentes orgánicas de P, como los residuos de cultivos y el estiércol, pueden ser utilizados por los organismos vivos a través de tres rutas diferentes:

El P orgánico, especialmente en forma de fosfatos de inositol, puede incorporarse directamente al humus estable, volviéndose menos disponible para su uso vegetal y microbiano, o puede ser mineralizado como ortofosfato mediante la descomposición microbiana.

De esta manera, parte del P que queda en el suelo puede ser incorporado a la biomasa microbiana durante la descomposición. Este P inmovilizado puede estar disponible como P soluble cuando la fracción de biomasa microbiana muere y es a su vez mineralizada por otros microorganismos.

Estos tres procesos hacen referencia al procesamiento del fósforo orgánico en el suelo (Mullen, 2019). Sin embargo, el proceso de disolución de la apatita y otros minerales secundarios de P pueden mejorarse mediante las actividades de microorganismos y plantas. La disolución o solubilización de estos minerales liberan ortofosfato al medio, donde pueden ser utilizados por las plantas u otros microorganismos.

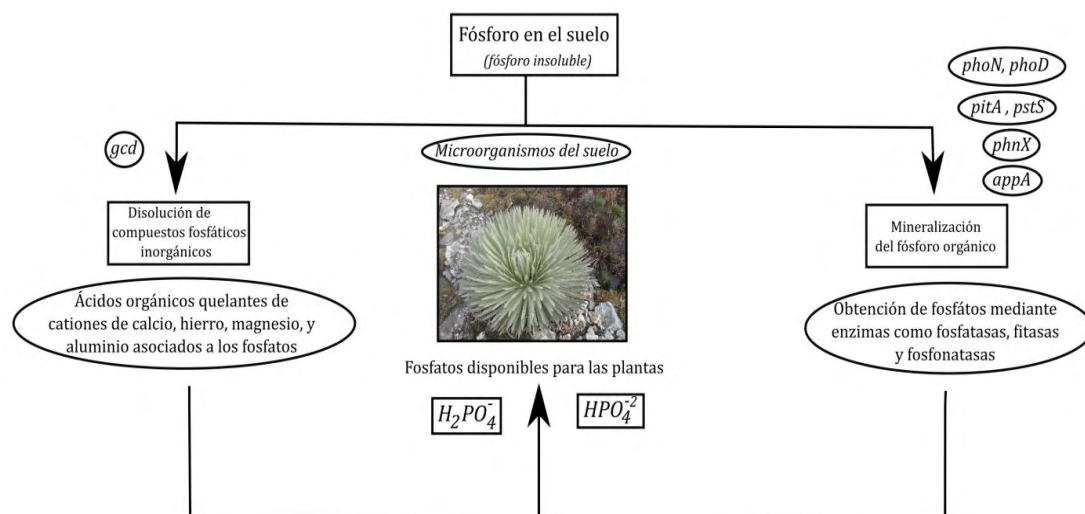


Figura 2. Ciclo general del fósforo. Se muestran los procesos de disolución y mineralización. En círculos y letra cursiva se indican los genes bacterianos involucrados en cada proceso. Figura recopilada a partir de varios artículos citados en el texto.

Mecanismos bacterianos para el ciclaje del fósforo

En el ciclo del fósforo participan un sinnúmero de microorganismos, siendo las bacterias heterótrofas uno de los grupos más importantes. La mayor parte del fósforo del suelo se encuentra en formas insolubles y las plantas sólo pueden absorber este mineral en dos formas iónicas solubles, la monobásica ($H_2PO_4^-$) y la dibásica (HPO_4^{2-}) (Ribaudó et al., 2013)

Según Beltrán (2014), las bacterias son capaces de liberar el fósforo no disponible para las plantas mediante dos mecanismos contrastantes, y así convertir las formas insolubles de fósforo en formas solubles. De esta manera, existen microorganismos solubilizadores de fosfato (MSF) y microorganismos mineralizadores de fósforo (MMF). Los MSF permiten la liberación de grupos fosfatos mediante la síntesis de ácidos orgánicos. En cambio, los MMF liberan fosfatos empleando mecanismos enzimáticos (Pezoa, 2021). Específicamente las bacterias favorecen la liberación de P desde fuentes inorgánicas por medio de la disolución/solubilización, y desde fuentes orgánicas a través de la mineralización (Beltrán, 2014). Diferentes cepas bacterianas presentes en biocostras podrían estar implicadas en procesos de disolución y mineralización del fósforo, lo que podría contribuir a la disponibilización de fósforo en estos suelos y, por lo tanto, al crecimiento vegetal.

Disolución o solubilización

El proceso de solubilización de fosfatos (lado izquierdo de la Figura 2) se refiere a la liberación del fósforo desde fuentes inorgánicas hacia el medio. El principal mecanismo microbiológico por el cual los compuestos fosfatados son solubilizados es la disminución del pH del medio extracelular hasta valores aproximados a 2.0, que son necesarios para que se pueda llevar a cabo la solubilización (Beltrán, 2014). Este fenómeno tiene lugar tras la liberación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular por parte de los microorganismos (Beltrán, 2014).

Según Beltrán (2014), los microorganismos utilizan los azúcares que toman de los exudados de las raíces de las plantas, lo metabolizan y liberan ácidos orgánicos. Entre los ácidos orgánicos más importantes destacan los ácidos glucónico, butírico, oxálico, succínico, málico, acético, láctico, cítrico, entre otros, que actúan como buenos quelantes de los cationes de calcio, hierro, magnesio y aluminio que están asociados a los fosfatos en los compuestos fosfáticos insolubles. Esto provoca la liberación del grupo fosfato que se encontraba unido al metal correspondiente (calcio, hierro, magnesio, aluminio, entre otros).

Gran parte de estos ácidos son sintetizados en el periplasma de muchas bacterias gram-negativas a través de la ruta de oxidación directa de la glucosa (DOPG por sus siglas en inglés Direct Oxidation Pathway of Glucose). Las enzimas de esta vía metabólica, como son la quinoproteína glucosa deshidrogenasa (GDH) y el gluconato deshidrogenasa (GADH), están ubicadas en la cara exterior de la membrana citoplasmática, lo que favorece la oxidación de sustratos en el espacio periplásmico. De esta manera, los diferentes ácidos orgánicos salen de las células y liberan grandes cantidades de fósforo soluble a partir de fosfatos minerales (Beltrán, 2014).

En particular, el ácido glucónico es el ácido más frecuente en la solubilización de fosfatos, y en bacterias se ha registrado que algunas especies de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Aerobacter*, *Rhizobium*, *Yarrowia*, *Streptosporangium*, *Achromobacter* y *Erwinia* son capaces de llevar a cabo su síntesis (Beltrán, 2014; Moreno et al., 2018). Otro ácido orgánico producido por bacterias solubilizadoras de fosfato es el ácido 2-cetoglucónico sintetizado por *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium meliloti* y *Bacillus firmus* (Beltrán, 2014).

Mineralización

Según Mullen (2019), la mineralización de fósforo (parte derecha de la Figura 2) por parte de los microorganismos es la transformación del fósforo proveniente de la materia orgánica en ortofosfato inorgánico.

Muchos microorganismos, incluyendo bacterias, son capaces de mineralizar el fósforo presente en compuestos orgánicos fosforados. Estas bacterias liberan el ortofosfato desde fuentes orgánicas, mediante reacciones enzimáticas de ortofosfato. Las principales enzimas involucradas en este proceso son la fosfatasa ácida (codificada por el gen *olpA*), la fosfatasa alcalina (gen *phoD*), la fitasa (gen *appA*), la fosfonatasa (gen *phnX*), y la CP liasa (gen *phnJ*; Liang et al., 2020). Todas estas reacciones de mineralización han sido registradas en especies bacterianas presentes en el suelo. Se han registrado diferentes especies de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, etc. capaces de mineralizar el ortofosfato (Liang et al., 2020).

- Fosfatasas

Son enzimas que llevan a cabo la hidrólisis de ésteres y anhídridos de ortofosfato-P. Según Tapia et al. (2013), en la biósfera, el P se encuentra principalmente en su mayor estado de oxidación (+5), como el ortofosfato inorgánico (PO_4^-), y los ésteres de ácido fosfórico. Estas formas químicas de fósforo generalmente consisten en fosfomonoésteres de inositol, fosfolípidos

y ácidos nucleicos que pueden ser hidrolizados por diferentes tipos de fosfatasa. Las fosfatasa más comúnmente encontradas en bacterias del suelo son las fosfomonoesterasas, que hidrolizan enlaces fosfomonoéster, siendo las más ampliamente estudiadas la fosfatasa ácida y la fosfatasa alcalina.

- Fitasas

Son enzimas capaces de catalizar la hidrólisis de ácido fítico (fitinas) o fosfatos de inositol, los cuales pueden constituir hasta un 50 % del P orgánico en el suelo (Mullen, 2019). Según Mullen (2019), estas enzimas extracelulares son excretadas por microorganismos, como bacterias del género *Escherichia*.

- Fosfonatasas

Son enzimas del tipo hidrolasas que catalizan la ruptura de enlaces carbono-fósforo presentes en compuestos del tipo fosfonatos. Los fosfonatos son compuestos organofosforados en los que el fósforo emplea una valencia +3 (ej. fosfonato, aminoetilfosfonato, fosfito) y donde el fósforo está enlazado directamente a un átomo de carbono, en lugar del enlace éster más común C-O-P (Tapia et al., 2013). Se conocen tres hidrolasas capaces de romper el enlace C-P: la fosfonoacetaldehído hidrolasa conocida como fosfonatasa, la fosfonoacetato hidrolasa y la fosfonopiruvato hidrolasa (Tapia et al., 2013).

Bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* son capaces de llevar a cabo la síntesis de fosfonatos. Sin embargo, sólo se ha demostrado que las especies *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus* pueden utilizar el 2-aminoetilfosfonato (2AEP; fosfonato más abundante en la naturaleza) como fuente de P, ya que degradan el enlace C-P con enzimas del tipo fosfonatasas.

La ruta de degradación del 2-aminoetilfosfonato en bacterias inicia con la transaminación del 2AEP a 2-fosfonoacetaldehído (PAA) ($\text{OHC-CH}_2\text{-PO}_3\text{H}_2$; Tapia et al., 2013). La enzima responsable de catalizar esta reacción es conocida como la 2AEP-piruvato aminotransferasa, la cual tiene alta afinidad por los sustratos 2AEP y ácido pirúvico. En el segundo paso de la ruta degradativa, el PAA es dividido hidrolíticamente en fosfato inorgánico y acetaldehído. La enzima que cataliza esta reacción es la fosfonoacetaldehído hidrolasa o fosfonatasa (Tapia et al., 2013).

Además de estas enzimas, también se han caracterizado varios transportadores de P que se encuentran en células de raíces de plantas y en microorganismos. Los transportadores son proteínas transmembranales que capturan el fosfato inorgánico y lo introducen a las células (Tapia et al., 2013).

Gran parte de las enzimas fosfatasa y fosfonatasas están codificadas por genes que forman parte del regulón *Pho* (Tapia et al., 2013). Según Santos (2015), el regulón de fosfato (*pho*) es un mecanismo regulador global involucrado en el manejo bacteriano de fósforo inorgánico (Pi). La mayoría de los genes activados por el regulón *Pho* son aquellos que codifican enzimas extracelulares capaces de obtener Pi a partir de fosfatos orgánicos, transportadores específicos de Pi y enzimas involucradas en el almacenamiento y ahorro del fósforo.

Entre los genes más importantes de este regulón destacan genes como el *phoA* que codifica para las fosfatasa alcalinas, las fosfolipasas (*phoD*), las fosfodiesterasas de glicerofosfodiéster

(*glpQ* y *ugpQ*), las fitasas (*phyC*) y las 5'-nucleotidasas (*ushA*). Específicamente, el gen del transportador de fósforo *pst* es uno de los genes más conservados del regulón *Pho* en todas las bacterias. Este regulón, además, exhibe genes encargados de codificar otros transportadores de fósforo, como lo es el gen *pit*, el cual codifica un transportador de fósforo de baja afinidad, el gen *phn* involucrado en la captación de fosfonatos en *Escherichia coli* y el gen *ugp* que interviene en la entrada de glicerofosfodiésteres a la célula (Santos 2015).

El regulón *Pho* está controlado por un sistema regulador de dos componentes que comprende una proteína sensora de histidina quinasa de membrana interna y un regulador de respuesta transcripcional citoplasmático. Estas proteínas han recibido diferentes nombres en algunas bacterias, como: *PhoR–PhoB* en *E. coli*, *PhoR–PhoP* en *Bacillus subtilis*, *PnpR–PnpS* en *Streptococcus pneumoniae*, *PhoR–PhoS* en *Corynebacterium glutamicum* y *PhoS–PhoS* en *Campylobacter jejuni* (Santos 2015). Además, Santos (2015) también indica que, ante la escasez de Pi, el regulador de respuesta es fosforilado en un residuo aspártico por la quinasa sensora. El regulador de respuesta fosforilado puede unirse a secuencias específicas en el ADN (conocidas como caja *PHO*) y activar o reprimir la transcripción de genes.

Genes funcionales de la ruta del fósforo

Para identificar la presencia de genes implicados en el metabolismo del fósforo se han diseñado diferentes cebadores oligonucleotídicos que se dirigen a genes que codifican para fosfatasa (*phoN*, *phoD*), fitasas (*appA*) y fosfonatas (*phnX*) así como la quinoproteína glucosa deshidrogenasa (*gcd*) y diferentes transportadores de P (*pitA*, *pstS*). Bergkemper et al. (2016) diseñaron cebadores de oligonucleótidos para amplificar genes microbianos que codifican enzimas que catalizan la mineralización del P orgánico del suelo (*phoD*, *phoN*, *appA*, *phnX*), la disolución de P inorgánico (*gcd*), así como genes que codifican sistemas de transporte de fosfato microbiano (*pitA*, *pstS*).

El balance entre la elevada especificidad de estos cebadores (es decir, la capacidad de reconocer una secuencia única dentro del ADN templado), y el alto grado de degeneración (una mezcla de secuencias de oligonucleótidos en las que algunas posiciones contienen una serie de bases posibles), permite amplificar genes de una gran diversidad de microorganismos del suelo, entre los que se incluyen bacterias y cianobacterias (Bergkemper et al., 2016; Ragot et al., 2015). Es por esto que el uso de dichos cebadores podría ser de gran utilidad en bacterias presentes en biocostras.

El nitrógeno

El nitrógeno (N) es otro de los nutrientes más importantes para el crecimiento de todos los organismos vivos, incluidas las plantas y las bacterias, pues forma parte de numerosas moléculas orgánicas, como son los aminoácidos, ácidos nucleicos e incluso moléculas de transferencia de energía. Es bien conocido que el nitrógeno atmosférico (N₂) no es asimilable por parte de las plantas vasculares, siendo necesaria su fijación y posterior reducción a amonio (NH₄) por

cianobacterias, cianolíquenes u organismos procariotas como bacterias heterótrofas (Castillo & Maestre, 2011).

En ecosistemas áridos y semiáridos, donde la cantidad de nitrógeno presente en el suelo es mucho más baja que en otros ecosistemas, la fijación de N_2 es llevada a cabo principalmente por los organismos que componen las biocostras (Belnap 2001). En diversos estudios se han registrado valores de fijación de N_2 por parte de las biocostras en ecosistemas áridos. Estos valores van de 0.2 kg ha⁻¹año⁻¹ a 100 kg ha⁻¹año⁻¹ bajo condiciones óptimas de humedad y temperatura (Castillo & Maestre, 2011).

Ciclo del nitrógeno

Según Nelson & Cox (2009), la fuente más importante de nitrógeno es la atmósfera, pues más del 90% del nitrógeno de la Tierra se encuentra como nitrógeno molecular, el cual no es fácilmente asimilable por las plantas. Una forma de entender cómo el nitrógeno ingresa al suelo y a las estructuras biológicas es mediante la comprensión del ciclo del nitrógeno (Figura 3), el cual nos permite conocer mejor el papel que tienen las bacterias en hacer este elemento disponible para las plantas.

El primer paso del ciclo consiste en la fijación (reducción) del nitrógeno atmosférico por parte de bacterias fijadoras de nitrógeno para proporcionar amoníaco (NH_3) o amonio (NH_4), el último de los cuales se ioniza fácilmente a partir del primero. Aunque el amoníaco puede ser utilizado por la mayor parte de organismos vivos, las bacterias del suelo, que obtienen su energía de la oxidación del amoníaco a nitrito (NO_2) y a nitrato (NO_3), son tan abundantes y activas que prácticamente todo el amoníaco que llega al suelo se oxida a nitrato. Este proceso se conoce como nitrificación (Figura 3).

Las plantas y muchas bacterias pueden incorporar y reducir fácilmente el nitrato y nitrito por acción de las nitrato y nitrito reductasas. El amoníaco así formado es incorporado a los aminoácidos por las plantas. Los animales a su vez utilizan las plantas como fuente de aminoácidos, tanto esenciales como no esenciales, para fabricar sus proteínas. Cuando los organismos mueren, la degradación microbiana de sus proteínas devuelve el amoníaco al suelo, donde bacterias nitrificantes lo convierten de nuevo en nitrito y nitrato.

El equilibrio entre el nitrógeno fijado y el nitrógeno atmosférico es mantenido por las bacterias que convierten el nitrato en N_2 en condiciones anaeróbicas, proceso denominado desnitrificación (Figura 3). Estas bacterias del suelo utilizan NO_3 en lugar de O_2 como aceptor final de electrones en una serie de reacciones que (al igual que la fosforilación oxidativa) generan un gradiente transmembranal de protones, que se aprovecha para sintetizar ATP (Nelson & Cox, 2009).

El ciclo del nitrógeno es cortocircuitado por un grupo de bacterias recientemente descubierto que lleva a cabo la oxidación anaerobia del amoníaco, o anammox (Figura 3), proceso que convierte amoníaco y nitrito en N_2 (Nelson & Cox, 2009).

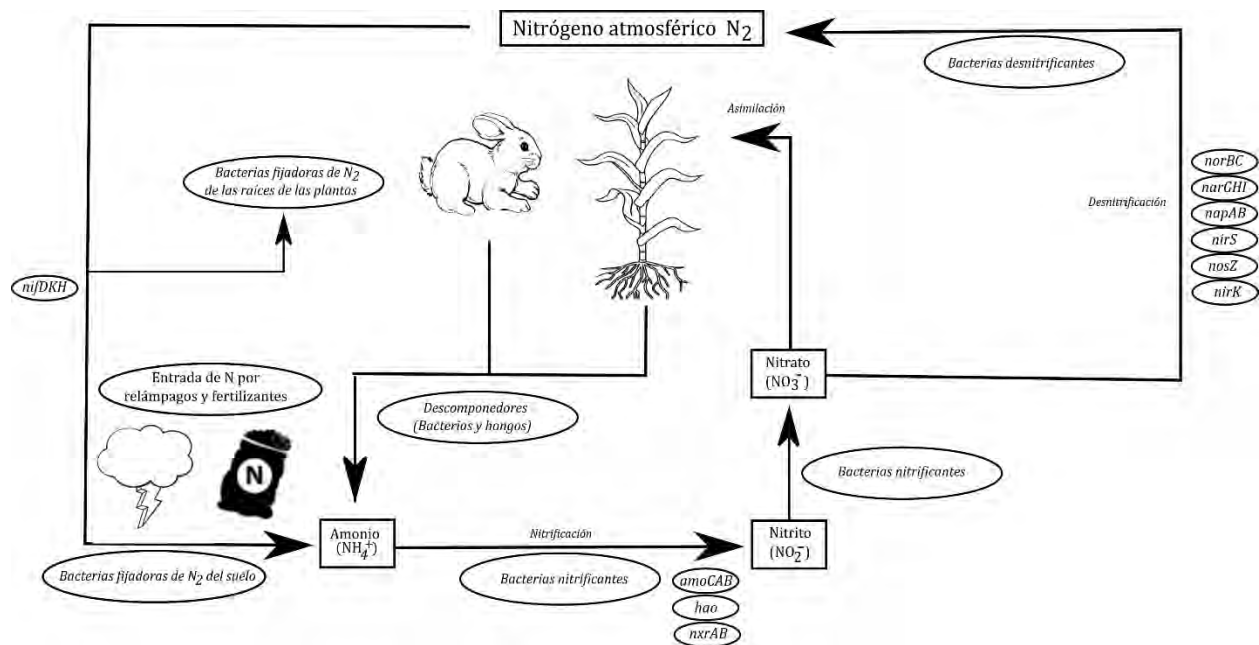


Figura 3. Ciclo del nitrógeno. Se muestra cada subruta del ciclo global del nitrógeno y en la periferia de las flechas, los genes bacterianos más importantes involucrados en cada proceso. Figura reconstruida a partir de varias fuentes citadas en el texto

Genes funcionales de la ruta del nitrógeno

Fijación de nitrógeno

La fijación biológica del nitrógeno se realiza por un complejo de proteínas muy conservado, denominado complejo de la nitrogenasa. Los componentes clave de este complejo son la dinitrogenasa reductasa y la dinitrogenasa. Según Nelson & Cox (2009), la dinitrogenasa reductasa (Mr 60.000) es un dímero formado por dos subunidades idénticas. Contiene un único centro redox del tipo 4Fe-4S, unido entre las subunidades, que puede ser oxidado y reducido por un electrón. Las dos subunidades idénticas de este dímero se encuentran codificadas por el gen *nifH* (Zehr et al., 2003). En cambio, la dinitrogenasa (Mr 240.000) es un tetrámero formado por dos copias de dos subunidades distintas, que contiene hierro y molibdeno; sus centros redox tienen un total de 2 Mo, 32 Fe y 30 S por tetrámero. Aproximadamente la mitad del hierro y del azufre se encuentran en dos centros 4Fe-4S conectados, denominados agregados P; el resto forma parte de un cofactor de hierro-molibdeno de un nuevo tipo. Los dos heterodímeros que conforman la dinitrogenasa son codificados por los genes *nifD* y *nifK*.

De los tres genes involucrados en la síntesis de la enzima nitrogenasa (*nifH*, *nifD* y *nifK*), el gen *nifH* (que codifica la subunidad de la nitrogenasa reductasa) es el más secuenciado y se ha convertido en el marcador molecular de elección para investigadores que estudian la filogenia, la diversidad y la abundancia de microorganismos fijadores de nitrógeno. Por lo tanto, muchos cebadores de PCR han sido desarrollados para apuntar al gen *nifH* con el propósito de amplificar

esta secuencia de genes a partir de muestras ambientales (Gaby & Buckley, 2012; John et al., 2012).

Nitrificación

El proceso de nitrificación es llevado a cabo por al menos tres enzimas diferentes. El primer paso es la conversión del amonio fijado a hidroxilamina, el cual es llevado a cabo por la enzima amonio/metano monooxigenasa codificada por el gen *amoCAB*. Posteriormente, la hidroxilamina es transformada en nitrito por la enzima hidroxilamina deshidrogenasa codificada por el gen *hao*. Finalmente, el nitrito es reducido hasta nitrato por la subunidad alfa de la nitrito oxidorreductasa, la cual es codificada por el gen *nxrA*.

Gen *amoCAB*: el gen *amoCAB* es un gen que codifica para enzimas del tipo amoníaco monooxigenasas (AMO) que llevan a cabo la oxidación del amoníaco (Sayavedra et al., 1998). El gen *amoA*, junto con los genes *amoC* y *amoB*, codifican para las diferentes subunidades de la amoníaco monooxigenasa (AMO). La AMO es una enzima de múltiples subunidades unida a la membrana, responsable de la oxidación del amoníaco a hidroxilamina, que luego se convierte en nitrito por la hidroxilamina oxidorreductasa. Estos genes están organizados en el operón *amoCAB* (Junier et al., 2009). Los dos polipéptidos de AMO están codificados por genes contiguos, *amoA* y *amoB*, que están precedidos por un tercer gen, *amoC*. Los grupos *amoCAB* están presentes en múltiples copias en bacterias nitrificantes de la subdivisión beta (Sayavedra et al., 1998). Si bien se ha demostrado que los genes que codifican las dos proteínas AMO estructurales putativas, *AmoA* y *AmoB*, se cotranscriben en el mismo ARNm, no se ha determinado si *amoC* también forma parte de la misma unidad transcripcional (Sayavedra et al., 1998).

Gen *hao*: la oxidación bacteriana aeróbica de amonio es un proceso importante en el ciclo global del nitrógeno. La enzima clave en la oxidación de hidroxilamina a nitrito es la hidroxilamina oxidorreductasa (HAO) de las bacterias aeróbicas oxidantes de amonio (AOB; Schmid et al., 2008). La hidroxilamina oxidorreductasa (HAO) normalmente cataliza la oxidación de NH_2OH a NO_2 (Kostera et al., 2010). La familia de la hidroxilamina oxidorreductasa (HAO) consta de proteínas que albergan siete grupos hemo de transferencia de electrones ligados con bis-His y un hemo catalítico de cinco coordenadas con ligadura axial de His. Los HAO oxidativos tienen una configuración homotrimérica con los monómeros unidos covalentemente entre sí a través de un entrecruzamiento doble único entre un residuo de tirosina y el resto hemo catalítico de una subunidad adyacente (Ferousi et al., 2021).

Desnitrificación

El proceso de desnitrificación inicia con la reducción del nitrato hasta nitrito por acción de la nitrato reductasa codificada por el gen *narGHI* o el gen *napAB*. Este nitrito es transformado en óxido nítrico por la enzima nitrito reductasa codificada por los genes *nirK* o *nirS*. El óxido nítrico es convertido hasta óxido nitroso por la enzima óxido nítrico reductasa codificada por el gen *norBC*. Finalmente, el óxido nitroso es llevado a nitrógeno atmosférico por la enzima óxido nitroso reductasa codificada por el gen *nosZ*.

Gen *narGHI*: el gen *narGHI* es uno de los genes más importantes de la reducción del nitrato en bacterias. Este gen codifica para una nitrato reductasa A que se encuentra unida a la membrana

terminal (*NarGHI*) en la especie *Escherichia coli* (Blasco et al., 2001). En el género *Pseudomonas*, estos genes conforman un solo operón, que va desde los genes *narI* (nitrato reductasa cadena gamma), *narJ* (nitrato reductasa cadena delta), *narH* (nitrato reductasa cadena beta) hasta *narG* (nitrato reductasa cadena alfa). La formación de la enzima depende de la inducción de este operón *nar*, *narGHJI*, que se compone de cuatro marcos de lectura abiertos (ORF). Estudios previos establecieron que los dos primeros genes en el operón *narG* y *narH* codifican las subunidades alfa y beta, respectivamente, mientras que la formación de la subunidad gamma, el citocromo bNR, depende de la expresión de los genes promotores distales (Sodergren et al., 1988). Según Richardson et al. (2007), esta nitrato reductasa unida a la membrana tiene su sitio activo orientado hacia el citoplasma en diferentes géneros bacterianos.

Gen *napAB*: los genes *napA* y *napB* son genes cuya proteína expresada es periplásmica. En la especie *Cupriavidus necator* la nitrato reductasa periplásmica es un heterodímero que puede reducir el nitrato a nitrito. Comprende una subunidad catalítica de 91 kDa (*NapA*) y una subunidad de 17 kDa (*NapB*) que participa en la transferencia de electrones. La subunidad más grande contiene un sitio activo de molibdeno con un cofactor de dinucleótido de bis-molibdopterina guanina, así como un grupo [4Fe-4S], mientras que la subunidad pequeña es un citocromo de tipo c di-hemo (Coelho et al., 2007). Según Siddiqui et al. (1993), en una cepa de *Alcaligenes eutrophus*, estos dos genes estructurales, denominados *napA* y *napB*, codifican polipéptidos de 93 y 18,9 kDa, respectivamente. Las comparaciones de secuencias indican que los productos génicos putativos se traducen con péptidos señal de 28 y 35 aminoácidos, respectivamente.

Genes *nirK* y *nirS*: los genes *nirS* y *nirK* codifican precursores de nitrito reductasas en diferentes bacterias con capacidad de desnitrificación. Están involucradas en la oxidación del nitrito hasta óxido nítrico. Estos genes estructurales de copia única son funcionalmente equivalentes, ya que codifican las nitrito reductasas, enzimas clave del proceso de desnitrificación, que son utilizadas como marcador molecular para las bacterias desnitrificantes (Braker et al 2000).

Gen *norBC*: los genes *norB* y *norC* forman parte de lo que se conoce, en el género *Pseudomonas*, del operón *norBC*, que codifica diferentes subunidades de la óxido nítrico reductasa. El gen *norB* codifica la subunidad B de la óxido nítrico reductasa y el gen *norC* la subunidad C de la óxido nítrico reductasa. Este operón ha sido identificado en el genoma de diferentes especies de *Pseudomonas* y de la especie *Paracoccus denitrificans* (Field et al., 2008). El complejo de dos subunidades de citocromo bc (*NorBC*) aislado de las membranas de la bacteria modelo desnitrificante del suelo *Paracoccus denitrificans* es el ejemplo mejor caracterizado de las óxido nítrico reductasas bacterianas respiratorias (Field et al., 2008). *NorBC* de *Paracoccus denitrificans* es un complejo transmembrana heterodimérico de múltiples hemo (Van Wonderen et al., 2013). Estas son miembros de la superfamilia de hemo-cobre oxidasas y se caracterizan por la composición elemental de su sitio activo, que contiene hierro en lugar de cobre, en el que se cataliza el acoplamiento reductor de dos moléculas de óxido nítrico para formar óxido nitroso (Field et al., 2008).

Gen *nosZ*: el gen *nosZ* es un gen que codifica el precursor de la óxido nitroso reductasa. Como sabemos, el N₂O es un producto intermedio en la ruta de desnitrificación, que consiste en la

reducción secuencial de NO_3 a N_2 a través de las metaloenzimas nitrato reductasa, nitrito reductasa, óxido nítrico reductasa y óxido nitroso reductasa. El gen *nosZ* codifica la subunidad catalítica de N_2O reductasa. La reducción del óxido nitroso es el paso final en la ruta de desnitrificación y representa la pérdida de N biológicamente disponible. El gen *nosZ* es en gran medida exclusivo de las bacterias desnitrificantes, aunque se han identificado algunas especies no desnitrificantes capaces de reducir el óxido nitroso (Scala & Kerkhof, 1998).

Anammox

La vía del anammox parte de la combinación de óxido nítrico con amonio para producir hidracina, mediante la enzima hidracina sintasa codificada por el gen *hzs*. Esta hidracina es convertida en nitrógeno atmosférico por la enzima hidracina deshidrogenasa codificada por el gen *hdh*.

Sideróforos

El hierro es uno de los metales más importantes para los organismos vivos y uno de los más abundantes en el suelo. Para los organismos vivos, específicamente para las plantas, el hierro es considerado un elemento esencial, pues forma parte de procesos claves del metabolismo celular, ya que actúa como cofactor de numerosas enzimas y participa en el transporte de oxígeno, la síntesis de ADN, la fijación de nitrógeno, la respiración y la fotosíntesis (Aguado et al., 2012). Sin embargo, en los últimos años, se ha determinado que el hierro actúa también como un represor del crecimiento de las plantas. Según Murugappan (2012), en las plantas, el exceso de hierro intracelular induce un estrés oxidativo perjudicial, ya que promueve la formación de radicales hidroxilos. Estos radicales tienen un gran poder oxidante afectando los sistemas biológicos, bien sea atacando directamente proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos, o iniciando la peroxidación de lípidos. Según Aguado et al. (2012), en la naturaleza, el hierro, a pesar de ser tan importante para el desarrollo celular, es un elemento que se encuentra escasamente disponible en el suelo debido a la rápida oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} y la subsecuente formación de hidróxidos insolubles.

Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular (< 10 KD) que, estructuralmente, poseen grupos funcionales (átomos donadores de electrones como oxígeno, nitrógeno y azufre, con potencial redox entre los -0.33 V y -0.75 V) a los que se pueden unir los iones férricos. Por lo tanto, los sideróforos son considerados quelantes de hierro que sirven como transportadores de hierro en las células (Olanrewaju et al., 2017). En la naturaleza existe un gran número de microorganismos capaces de sintetizar sideróforos. Entre ellos destacan bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Azospirillum* y *Rhizobium* (Sajeed et al., 2013; Aguado et al., 2012).

Los microbios productores de sideróforos pueden prevenir o disminuir la proliferación de patógenos al reducir la cantidad de hierro que está disponible para un patógeno. Las PGPB que sintetizan sideróforos previenen la proliferación de fitopatógenos secretando sideróforos con una afinidad extremadamente alta por el hierro. Estos sideróforos se unen fuertemente a la mayoría del Fe^{3+} que está presente en la rizósfera de la planta huésped, lo que previene la proliferación de

cualquier patógeno fúngico y bacteriano en la rizósfera de la planta hospedera (Aguado et al., 2012).

Algunos microorganismos sintetizan sideróforos a partir de péptidos sintetizados no ribosómicos (NRPS del inglés nonribosomal peptide synthetases), que tienen un peso molecular de 500 a 10.000 Da (Crosa & Walsh, 2002). Se han clasificado a los sideróforos en tres tipos, dependiendo del grupo funcional al que se encuentren unidos: hidroximatos, catecolatos y carboxilatos.

Hidroximatos

Los hidroximatos son sideróforos con cadenas laterales de N-hidroxi-aminoácido, con el átomo de oxígeno como uno de los ligandos para Fe^{3+} (Crosa & Walsh, 2002). Es decir, son sideróforos de la forma $C(=O)N(OH)R$, donde R es un aminoácido o un derivado (Sajeed et al., 2013). Cada grupo hidroxamato proporciona dos moléculas de oxígeno, que forman un ligando bidentado con hierro. Por lo tanto, cada sideróforo forma un complejo octaédrico hexadentado con Fe^{3+} . Según Sajeed et al. (2013), los hidroximatos son sintetizados por bacterias y hongos. Por ejemplo, la ferribactina es producida por *Pseudomonas fluorescens*. Igualmente, la gonobactina y nocobactina son producidas en pequeñas cantidades por las bacterias *Neisseria gonorrhoeae* y *N. meningitidis*.

Catecolatos

Los catecolatos son otro grupo de sideróforos formados por grupos hidroxilos adyacentes de los anillos de catecol, derivados del 2,3-dihidroxibenzoato (DHB; como en la enterobactina), o del 2-hidroxibenzoato (salicilato) que contiene restos fenólicos como ligandos de hierro (Crosa & Walsh, 2002). La enterobactina es producida por *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Klebsiella pneumoniae*, mientras que la agrobactina y la parabactina son producidas por *Agrobacterium tumefaciens* y *Paracoccus denitrificans*, respectivamente (Sajeed et al., 2013).

Carboxilatos

Son sideróforos que se agrupan juntos debido a que su estructura no corresponde ni a la de los catecolatos ni a la de los hidroxamatos. Según Sajeed et al. (2013) estos son producidos principalmente por *Rhizobium meliloti* y *Staphylococcus hyicus*, siendo el carboxilato mejor caracterizado la rizobactina. La rizobactina es un ácido carboxílico poliamínico con etilendiaminodicarboxilo y fracciones de hidroxicarboxilo como quelantes de hierro.

Producción de fitohormonas

Las fitohormonas (hormonas vegetales) son moléculas orgánicas que son sintetizadas por diferentes especies de plantas o microorganismos. Estas moléculas, en pequeñas concentraciones (<1 mM), regulan la expresión de genes implicados en el crecimiento y desarrollo vegetal. Estas moléculas influyen sobre la fisiología vegetal de muchas maneras diferentes, por ejemplo regulando el volumen radicular, la caída de las hojas, la maduración del fruto, la división celular, entre otros (Velasco et al., 2019).

Muchas rizobacterias (bacterias asociadas a las raíces de las plantas) o bacterias de vida libre, tienen la capacidad de producir fitohormonas, siendo éste uno de los mecanismos más estudiados que se asocian a la promoción del crecimiento vegetal por parte de las PGPB. Entre estas PGPB destacan algunas como *Bacillus amyloliquefaciens* en cultivos de papa, *Azospirillum* y *Klebsiella* en cultivos de maíz, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, y *Arthrobacter* y *Rahnella* en plantaciones de *Eucalyptus nitens*. Igualmente, según Kong et al. (2022), especies como *Pseudomonas spp.*, *Streptomyces spp.*, *Burkholderia spp.*, también son consideradas PGPB pues se encuentran involucradas en la síntesis o regulación de fitohormonas (Glick, 2012).

Las principales fitohormonas sintetizadas o reguladas por PGPB incluyen auxinas, citocininas, giberelinas y etileno (Rives et al., 2007).

Auxinas

Las auxinas son hormonas vegetales que tienen una estructura con una carga negativa posicionada en un grupo carboxilo, separada de otra carga residual positiva que puede estar localizada sobre un anillo indólico o aromático, como en el AIA o el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), respectivamente. Actualmente, se ha podido comprobar que el anillo no es estrictamente necesario, ya que el N,N-dimetilcarboximetiltiocarbamato, carente de anillo, pero con la distancia adecuada entre las cargas, posee carácter auxínico (Azcon y Talón, 2013).

Las auxinas se encuentran entre las hormonas más importantes en el desarrollo de las plantas, puesto que se encargan de los procesos de diferenciación del tejido vascular, dominancia apical, iniciación y elongación de la raíz (lateral y adventicia), división celular y formación del tallo (Olanrewaju et al., 2017). Además, las auxinas estimulan la germinación de semillas y tubérculos, aumentan la tasa de xilema, influyen sobre procesos de control del crecimiento vegetativo, median las respuestas a la luz y la gravedad, participan en la florescencia y la fructificación de las plantas, y también afectan la fotosíntesis, la formación de pigmentos, la biosíntesis de varios metabolitos y la resistencia a condiciones estresantes (Olanrewaju et al., 2017; Gamalero & Glick., 2011). También, se ha registrado que elevadas concentraciones de auxinas provocan cambios transcripcionales en genes relacionados con otras hormonas (Backer et al., 2018).

Aunque se han descrito varias auxinas naturales, el ácido indol-3-acético (AIA) es la auxina más estudiada y la más producida por PGPB, y con frecuencia se consideran auxina y AIA como términos intercambiables (Gamalero & Glick., 2011).

Vía del ácido indol-3-acético (AIA)

El ácido indol-3-acético (AIA) es un compuesto orgánico derivado del indol que contiene un grupo carboximetilo en la posición 3 del anillo indólico (Figura 4).

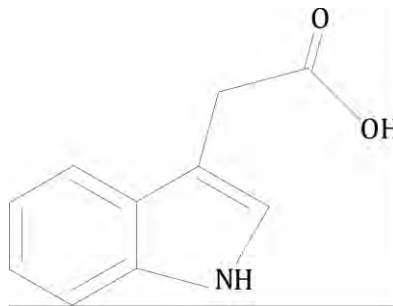


Figura 4. Estructura química del ácido indol-3-acético (AIA). Fuente: Azcón & Talón (2013).

Muchos microorganismos son capaces de sintetizar AIA. Según Patten & Glick (1996) alrededor del 80% de los microbios de la rizósfera o de vida libre podrían sintetizar y liberar auxina como metabolito secundario. Entre estos microorganismos se incluyen bacterias del suelo, hongos y arqueas, entre los que se destacan los grupos de metilobacterias, actinobacterias, cianobacterias y algunos estreptomicetos. Por ejemplo, según Santos et al. (2021), especies de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* promueven el crecimiento de las plantas debido a que son capaces de sintetizar ácido indol-3-acético.

Según Gamalero & Glick (2011), el AIA sintetizado por estos grupos bacterianos afecta principalmente al sistema radicular de las plantas adyacentes, aumentando su tamaño, peso, número de ramificaciones y el área de superficie en contacto con el suelo, mejorando la nutrición de la planta y su capacidad de crecimiento (Velasco et al., 2019). El AIA es sintetizado en las plantas y en bacterias a partir del aminoácido triptófano. Las bacterias toman el triptófano presente en los exudados de las raíces de las plantas y lo metabolizan para producir AIA.

Actualmente, se han caracterizado cinco vías para la biosíntesis de auxinas en bacterias. Estas vías, constitutivamente expresadas o inducibles, codificadas por ADN genómico o plasmídico, se han clasificado según su intermediario (Gamalero & Glick., 2011; Olanrewaju et al., 2017).

Vía del indol-3-piruvato (IPA)

Según Vega et al. (2016), la ruta del indol-3-piruvato es considerada como la principal vía de biosíntesis de AIA en las plantas. Sin embargo, se ha comprobado la producción de AIA por la vía IPA en especies bacterianas como *Pantoea agglomerans* y *Enterobacter cloacae*, y según Gamalero & Glick (2011), en especies de los géneros *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Rhizobium* y en cianobacterias.

Esta vía tiene como primera etapa la conversión de triptófano a ácido indol-3-pirúvico (IPA) por una aminotransferasa. En una segunda etapa el IPA se descarboxila a ácido indol-3-acetaldehído (AIAld) por la indol-3-piruvato descarboxilasa (IPDC), siendo esta la etapa limitante de la síntesis. El gen *ipdC* que codifica para la enzima IPDC ha sido caracterizado en algunas bacterias como *Azospirillum brasilense*, *E. cloacae*, *Pseudomonas putida*, *P. agglomerans* y *Paenibacillus polymyxa*. En la etapa final, el AIAld es oxidado a AIA por la indol-3-acetaldehído deshidrogenasa.

Vía indol-3-acetamida (IAM)

La ruta del indol-3-acetamida es una de las vías mejor caracterizada en bacterias. Sin embargo, también se han descrito algunos genes en plantas, pero se ha determinado que estas no poseen algunos de los intermediarios metabólicos de la ruta. Esta vía metabólica es llevada a cabo, principalmente, por especies bacterianas patógenas, las cuales afectan el desarrollo celular de las plantas debido a la producción excesiva de AIA. Sin embargo, también se han registrado especies bacterianas como *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas savastanoi*, *P. syringae*, *P. agglomerans*, *Rhizobium sp.* y *Bradyrhizobium japonicum* con los genes implicados en la ruta (Backer et al., 2018; Velazco et al., 2020; Kong y Hongguang, 2022).

Los genes, las proteínas y la regulación de esta ruta metabólica han sido caracterizados y esta comprende dos etapas. En la primera, el triptófano es convertido en indol-3-acetamida (IAM) por la enzima triptófano-2-monooxigenasa (IaaM), que está codificada en el gen *iaaM*. En la segunda, el IAM es convertido a AIA y amonio, mediante una IAM hidrolasa (IaaH), que es codificada por el gen *iaaH* (Vega et al., 2016).

Vía del indolacetaldoxima (IAOx)

Esta ruta es una de las menos conocidas y caracterizadas en bacterias. Sin embargo, es bastante común en plantas de la familia *Brassicaceae*. La vía inicia con la descarboxilación oxidativa del triptófano hasta indolacetaldoxima, la cual es catalizada por la enzima triptófano descarboxilasa. Esta enzima cataliza dos N-hidroxilaciones sucesivas de L-triptófano, los primeros pasos en la biosíntesis tanto de la auxina como del alcaloide indol fitoalexina camalexina. El producto de las dos hidroxilaciones, N,N-dihidroxi-L-triptófano, es extremadamente lábil y se deshidrata espontáneamente. Esta pérdida de agua genera indolacetnitrilo. Se cree que esta reacción es llevada a cabo por la enzima indolacetaldoxima deshidratasa. El acetnitrilo es hidrolizado por la enzima nitrilasa para producir AIA.

Vía del indolacetaldehído (IAH)

La síntesis de AIA por la vía del indolacetaldehído inicia con la catálisis del triptófano hasta indol-3-piruvato por las enzimas triptófano aminotransferasas, que no han sido caracterizadas en bacterias (sólo en animales, plantas e incluso hongos). El indol-3-piruvato es descarboxilado hasta indol-3-acetaldehído por las enzimas indol-3-piruvatodescarboxilasa o fenilpiruvato descarboxilasa, las cuales sí han sido caracterizadas en bacterias del género *Pseudomonas*. Finalmente, el indol-3-acetaldehído producido es oxidado por la enzima indol-3-acetaldehído oxidasa para producir AIA.

Vía de la triptamina

Finalmente, la ruta de síntesis de AIA utilizando como intermediario la triptamina, es catalizada por la enzima triptófano decarboxilasa para producir, a partir de triptófano, la triptamina, que, tras una desaminación oxidativa, se transforma en indolacetaldehído, entrando así a la ruta del indol-3-piruvato ya indicada.

Citoquininas

Las citoquininas son otro grupo de hormonas vegetales sumamente importantes para las plantas. Estas son moléculas derivadas de la adenina con una cadena lateral unida al grupo amino 6 del anillo purínico, donde la posición N6 de la adenina se sustituye con un isoprenoide (como en zeatina), o una cadena lateral aromática (como en kinetina). (Frébert et al., 2011)

Según Velasco et al. (2019), las citoquininas se pueden dividir en dos grupos principales, las citoquininas isoprenoides y las aromáticas. Dentro de las citoquininas isoprenoides se encuentran la (cis- y trans-) zeatina, la isopenteniladenina y la dihidrozeatina. Por otra parte, las citoquininas aromáticas incluyen la benciladenina, la kinetina y la topolina.

En las plantas, las citoquininas promueven procesos como la división y diferenciación celular, el incremento del área de la raíz mediante la formación de raíces adventicias, formación de hojas, así como la prevención de la senescencia (Gamalero & Glick, 2011). También están involucradas en la interrupción de la quiescencia de yemas latentes, activación de la germinación de semillas, promoción de la ramificación, acumulación de clorofila y expansión de las hojas. Además, las citoquininas regulan la expresión del gen que codifica para la expansina, una proteína que induce el aflojamiento de las paredes celulares de las plantas y, por lo tanto, facilita la expansión de las células vegetales impulsada por la turgencia, lo cual afecta tanto al tamaño como a la forma de las células (Gamalero & Glick, 2011).

La síntesis de citoquininas en bacterias fue reportada por primera vez en la década de los 70s, cuando se encontraron exudados similares a las citocininas en filtrados de cultivo de *Rhizobium leguminosarum* y *Bradyrhizobium japonicum*. Estos exudados fueron identificados posteriormente como zeatina. En la actualidad se han encontrado más de 30 diferentes compuestos de citoquininas promotoras de crecimiento en las plantas producidas por microorganismos asociados a las plantas, tales como zeatina, isopenteniladenina, dihidroxizeatina, entre otras.

La zeatina (Figura 5) puede ser sintetizada en medios de cultivo de bacterias como *Azotobacter*, *Pantoea agglomerans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus polymyxa* (Olanrewaju et al., 2017). También *Arthrobacter giacomelloi*, *Azospirillum brasilense*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Bacillus licheniformis*, *Paenibacillus polymyxa*, *Pseudomonas fluorescens* y *Rhizobium leguminosarum* son capaces de sintetizar zeatina (Velasco et al., 2019).

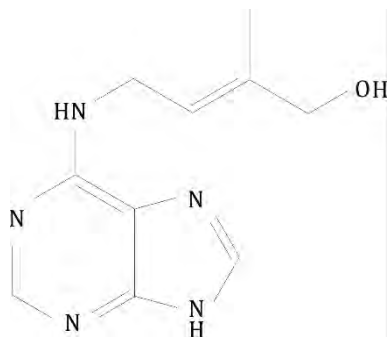


Figura 5. Estructura química de la zeatina. Fuente: Azcón & Talón (2013).

En bacterias, se ha caracterizado el gen que codifica la enzima responsable de la síntesis de citoquininas (gen de la isopenteniltransferasa *ipt*). Este gen se identificó inicialmente en *Agrobacterium tumefaciens* y posteriormente fue encontrado en bacterias metilotróficas y metanotróficas (Gamalero & Glick, 2011). Desde entonces, se han encontrado que muchos PGPB, incluidos en los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bacillus* y *Pseudomonas*, son capaces de sintetizar esta hormona (Pérez et al., 2015).

La isopentiltransferasa (tRNA IPT) es la principal enzima involucrada en la síntesis de citoquininas en bacterias y plantas. La biosíntesis directa de las citoquininas isoprenoides es la N₆-prenilación de la adenosina 5'-fosfato (AMP, ADP o ATP) con DMAPP rindiendo los correspondientes ribósidos mono, di y trifosfato de iP (Arrillaga, 2017).

Giberelinas

Las giberelinas son compuestos derivados del difosfato de isopentenilo (diterpenoides tetracíclicos). Normalmente, tienen 19 ó 20 átomos de carbono en su esqueleto principal. Actualmente, 136 estructuras de giberelinas han sido identificadas y están representadas como GA₁– GA₁₃₆, aunque sólo algunas son bioactivas (Olanrewaju et al., 2017).

En las plantas, las giberelinas regulan el crecimiento vegetal, pues participan en diversos procesos metabólicos, incluidos la germinación de semillas, elongación del tallo, floración, formación del fruto y la altura de la planta (Velasco et al., 2019). También inducen la absorción eficiente de iones dentro de la planta, lo que aumenta el crecimiento y mantiene el metabolismo de las plantas bajo condiciones normales y condiciones de estrés (Velasco et al., 2019; Gamalero & Glick, 2011).

Según Gamalero & Glick (2011) las giberelinas son sintetizadas por plantas superiores, hongos y bacterias. La síntesis bacteriana de giberelinas se registró por primera vez en el año 1979 en *Azospirillum brasilense* y *Rhizobium*. Sin embargo, actualmente se sabe que diferentes géneros bacterianos como *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Agrobacterium*, *Clostridium*, *Rhizobium*, *Burkholderia* y *Xanthomonas* son capaces de llevar a cabo la síntesis de giberelinas (Gamalero & Glick, 2011).

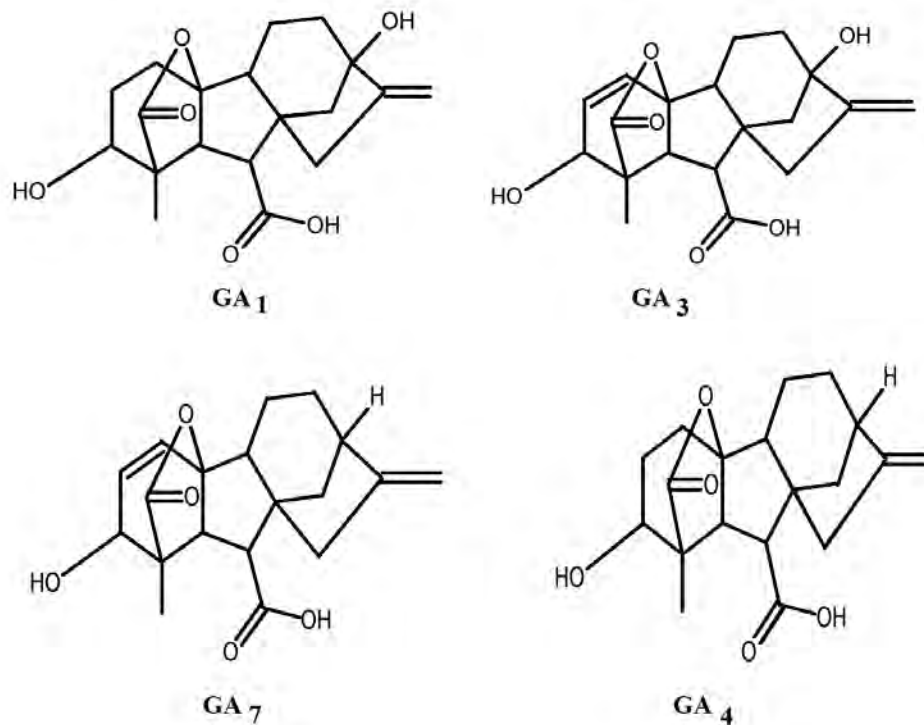


Figura 6. Estructura química de las cuatro giberelinas sintetizadas por bacterias. Figura modificada de Olanrewaju et al. (2017).

De las 136 giberelinas caracterizadas, sólo cuatro GA son sintetizadas por bacterias (GA₁, GA₃, GA₄ y GA₂₀; Figura 6). GA₁ y GA₄ son las giberelinas más comunes sintetizadas por PGPB. Las giberelinas pueden ser sintetizadas por dos rutas diferentes en plantas y hongos. La primera de ellas usa como intermediarios el hidroximetilglutaril-CoA y el mevalonato, mientras que la segunda, descubierta más recientemente, usa como intermediario el fosfato de gliceraldehído y el piruvato (Avalos et al. 1999). En bacterias se conoce poco sobre la síntesis de giberelina. Sin embargo, Olanrewaju et al. (2017) indica que la bioquímica de las giberelinas en bacterias tiende a ser un poco diferente a la de los demás organismos. En las bacterias, la vía de síntesis consiste en un grupo de enzimas particulares que realizan transformaciones relevantes, ya que estas comparten poca o ninguna homología con las enzimas correspondientes a los análogos funcionales en plantas y hongos.

Según Sánchez (2018), la primera evidencia clara sobre el mecanismo utilizado por las bacterias fue la identificación de un clúster que codifica para citocromo P450 conformado por los genes *cyp112*, *cyp114* y *cyp117* en *Bradyrhizobium japonicum*. Además, también en *B. japonicum* se demostró la existencia de genes putativos que codifican para la enzima ent-copalil difosfato sintetasa (CPS) y entkaureno sintetasa (KS). Adicionalmente, se han encontrado homólogos para los genes mencionados en otras rizobacterias como *Sinorhizobium fredii*, *Mesorhizobium loti* y *Rizobium etli*, las cuales han resultado también ser productoras de giberelinas y han demostrado la capacidad de producir entkaureno a partir de geranilgeranil difosfato. Por otro lado, se ha

identificado un operón homólogo en el patógeno de arroz *Xanthomonas oryzae* que de igual forma codifica para la producción de CPS y KS, que son capaces de producir entkaureno.

Etileno

El etileno es una fitohormona gaseosa, considerada como la hormona vegetal con la estructura química más simple (Figura 7).

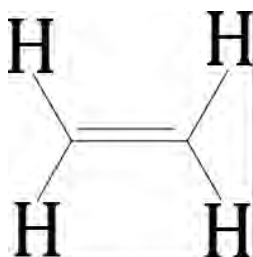


Figura 7. Estructura química del etileno. Fuente: Azcón & Talón (2013).

Esta fitohormona está involucrada en la regulación de numerosos procesos fisiológicos de las plantas, como la germinación de semillas, el crecimiento de plántulas, la maduración de frutos, desarrollo de las flores, abscisión de las hojas y senescencia. Igualmente, el etileno está involucrado en procesos de modulación de la respuesta al estrés (Weingart et al., 1996).

Según Velasco et al. (2019), las plantas, al ser organismos sésiles, son frecuentemente sometidas a diversos tipos de estrés. Según Gamalero & Glick (2011), el etileno modula la respuesta tanto al estrés biótico como abiótico en las plantas. De hecho, el término “estrés de etileno” describe el aumento en la síntesis de etileno asociado con tensiones ambientales que incluyen temperaturas extremas, alta luz, inundaciones, sequías, presencia de metales tóxicos y contaminantes orgánicos, radiación, heridas, depredación de insectos, alto contenido de sal y presencia de varios patógenos, incluidos virus, bacterias y hongos.

El aumento del nivel de etileno formado en respuesta al estrés ambiental modula los síntomas en la planta, pues puede exacerbar los síntomas de estrés o puede conducir a respuestas que mejoran la supervivencia de la planta en condiciones adversas (Gamalero & Glick, 2011). Este comportamiento se explica mediante un modelo de dos fases. Cuando las plantas son expuestas a condiciones de estrés, responden rápidamente con un pequeño pico de etileno que inicia una respuesta protectora de la planta, como la transcripción de genes relacionados con la patogénia e inducción de resistencia adquirida. Si el estrés es crónico o intenso, se produce un segundo pico mucho mayor de etileno, a menudo 1 a 3 días después. Este segundo pico de etileno induce procesos como la senescencia, clorosis y abscisión, que puede conducir a una inhibición significativa de la planta, crecimiento y supervivencia (Gamalero & Glick, 2011).

Además de las plantas, una variedad de microorganismos, incluyendo hongos y bacterias, son capaces de sintetizar etileno. En 1985 se determinó que la especie *Pseudomonas syringae* sintetiza grandes cantidades de etileno (Weingart et al., 1996). En microorganismos, el etileno se produce a través del ácido 2-ceto-4-metilbutírico (KMBA), un derivado transaminado de la

metionina, por una reacción mediada por NADH:Fe(III)EDTA oxidoreductasa, como en *Escherichia coli* y *Cryptococcus albidus*, o vía 2-oxoglutarato, por una enzima formadora de etileno (EFE) como en *Pseudomonas syringae* y *Penicillium digitatum* (Weingart et al., 1996).

Otro mecanismo importante mediado por bacterias y otros microorganismos es la regulación de la producción de etileno en las plantas. En las plantas, el etileno se produce a partir de la metionina a través de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico. Desde hace años, se ha determinado que las bacterias regulan el etileno endógeno en las plantas como consecuencia de la síntesis de una enzima capaz de degradar este precursor en la síntesis del etileno en las plantas (ACC desaminasa). Esta enzima actúa degradando el precursor de etileno (ACC) a amoníaco y acetobutirato (Velasco et al., 2019).

Actualmente, las cepas bacterianas que presentan ACC desaminasa se han identificado en una amplia gama de géneros como *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Methylobacterium*, *Mesorhizobium*, *Pseudomonas* y *Sinorhizobium* (Velasco et al., 2019).

www.bdigital.ula.ve

Hipótesis

Dado que las biocostras son comunidades pioneras que influyen de manera importante sobre la formación del suelo y la colonización vegetal en escenarios de sucesión primaria en regiones desérticas frías, entonces las cepas bacterianas psicrófilas y psicrotolerantes aisladas de las biocostras establecidas tras el retroceso del glaciar del Pico Humboldt podrían cumplir funciones ecológicas relacionadas con el ciclaje de nutrientes esenciales como nitrógeno y fósforo, y la producción de hormonas vegetales y sideróforos.

www.bdigital.ula.ve

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el posible rol ecológico de aislados bacterianos psicrófilos y psicrotolerantes presentes en las biocostras del frente del glaciar del Pico Humboldt.

Objetivos específicos

- Aislar diferentes cepas bacterianas psicrófilas y psicrotolerantes a partir de muestras de biocostras presentes en la transecta donde estuvo ubicado el glaciar del Humboldt en el año 2009.
- Identificar, por medio de la secuenciación del gen *ARNr 16S*, las cepas bacterianas aisladas de las biocostras.
- Identificar, mediante análisis *in silico*, la presencia de los genes necesarios para las rutas metabólicas del nitrógeno y fósforo, hormonas vegetales y sideróforos.

www.bdigital.ula.ve

Metodología

Muestreo de biocostras

Las muestras de biocostra fueron recolectadas en el suelo incipiente (suelo en formación) en el frente del glaciar del Sinigüis, ubicado en el Pico Humboldt (4.942), el cual tiene coordenadas $8^{\circ} 33' 0.8''$ N, $71^{\circ} 59' 50.56''$ W y está ubicado en el Parque Nacional Sierra Nevada, Venezuela (Figura 8).

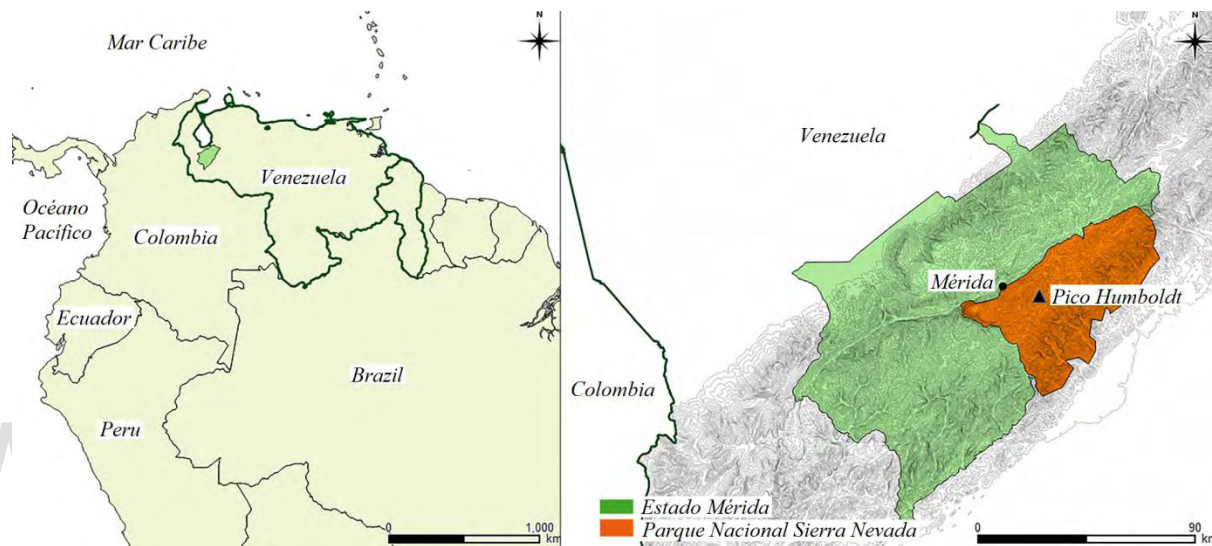


Figura 8. Área de estudio. Panel de la izquierda: ubicación geográfica de Venezuela. Panel de la derecha: mapa del estado Mérida donde se muestra la ubicación del Parque Nacional Sierra Nevada y del pico Humboldt. Figura modificada de Llambí et al. (2021).

Según Llambí et al. (2021) la precipitación media anual en esta región oscila, a lo largo del año, entre 1.000 y 1.200 mm, con una alta variabilidad interanual. En la estación microclimática más cercana al pico Humboldt (la estación de Pico Espejo, a 4.766 msnm) se ha registrado en promedio, una precipitación anual de 1.173 mm y $0,4^{\circ}\text{C}$ de temperatura. En cuanto a la geología de la zona, las rocas en formación en las transectas de muestreo son del tipo metamórficas de origen precámbrico. Entre ellas destacan bandas gneis, esquisto y anfibolita, con frecuentes diques graníticos y vetas de cuarzo (Llambí et al., 2021).

El muestreo tuvo lugar en diciembre de 2019, en la transecta donde estaba presente el glaciar del Humboldt en el año 2009 (Figura 9) y consistió en la toma y homogenización de cinco réplicas de suelo ubicado dentro de biocostras (Figura 1). Las muestras se colectaron en condiciones lo más estériles posibles, al lado de una cocinilla Coleman® encendida, con uso de tapabocas y empleando espátulas flameadas. El suelo fue introducido y preservado en pequeñas bolsas Whirl-Pak® estériles, y guardado en frío hasta su llegada al laboratorio y congelamiento a -20°C .

Aislamiento y caracterización cultural de las cepas bacterianas

Se aislaron las bacterias psicrófilas y psicrotolerantes a partir de la muestra compuesta de suelo congelado.

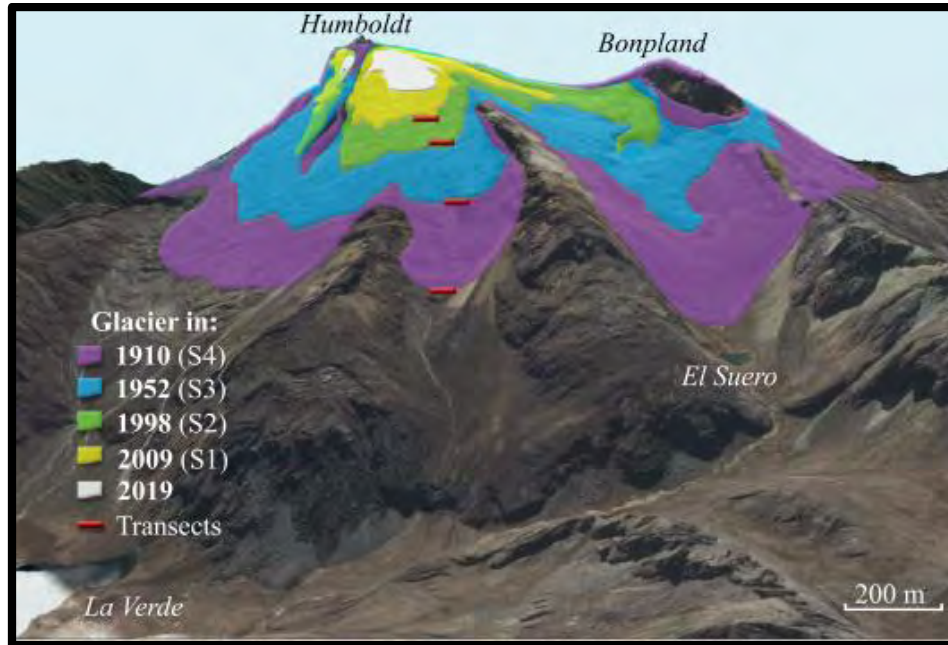


Figura 9. Vista general de la cara noroeste de los picos Humboldt y Bonpland. Se indica la ubicación de las transectas y la cobertura glaciar en diferentes momentos entre los años 1910 y 2019. Figura tomada de Llambí et al., (2021).

El aislamiento fue llevado a cabo en el laboratorio empleando Caldo Luria-Bertani (LB) y Agar 2A de Reasoner (R2A; Reasoner et al. 1985), y aplicando técnicas de siembra por rastrillo, por agotamiento y enriquecimiento en caldo, realizando tantos ciclos de aislamiento como fueran necesarios para obtener cultivos axénicos. El crecimiento de las cepas se realizó a temperaturas de ~5 °C en estufa, favoreciendo el crecimiento de bacterias psicrófilas y psicrotolerantes. La caracterización cultural de cada colonia se hizo de acuerdo con las siguientes características:

- Forma
- Textura
- Superficie
- Consistencia
- Borde
- Pigmentación
- Opacidad

Una vez aisladas y caracterizadas culturalmente las cepas bacterianas, estas fueron almacenadas a -20 °C utilizando glicerol (40%) como agente crioprotector. Cuando era necesario, las cepas bacterianas eran reactivadas mediante enriquecimiento en caldo y posterior siembra por agotamiento en placa.

Identificación molecular de las cepas bacterianas

Con base en la obtención de colonias aisladas en placas, se realizó una PCR de colonia de cada cepa bacteriana aislada, lisando las células para acceder al ADN, como se indica en Pérez et al. (2007). Se amplificaron secuencias de ~1500 pb del marcador *ARNr 16S*, utilizando los cebadores universales para bacterias fD1 y rD1 (Weisburg et al. 1991). Se utilizó un programa de PCR con touch-down, iniciando con una desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido de una fase de hibridación que comprende 10 ciclos (94 °C por 1 min, 65 °C por 1 min y 72 °C por 2 min) y 25 ciclos (94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 2 min) bajando la temperatura 1 °C por ciclo. Finalmente, la fase de elongación fue a 72 °C por 10 min. Las cantidades de los reactivos utilizados para las mezclas de reacción de las PCRs se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Proporción de reactivos en la mezcla de reacción para las PCRs

Reactivo	Cantidad (ul)
Agua estéril libre de nucleasas	18
Platinum 2X Mastermix*	25
Cebador fD1(10uM)	1
Cebador rD1 (10uM)	1
ADN (lisado de la colonia)	5
Total	50

*2X Mastermix (Invitrogen Platinum Green Hot Start PCR Master Mix): incluye dNTPs, Taq polimerasa, cloruro de magnesio y buffer.

Los productos de PCR obtenidos se corrieron en geles de agarosa 1% en una cámara electroforética utilizando buffer TAE 1X como buffer de corrida, SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen) como revelador del ADN, y un marcador de peso molecular como referencia del tamaño del producto amplificado. Éstos fueron purificados utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), y enviados a secuenciar a Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur).

Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas, se procesaron y compararon con bases de datos remotas Web de ácidos nucleicos: National Center for Biotechnology Information-NCBI y SILVA high quality ribosomal RNA database (Quast et al., 2013), para obtener la secuencia nucleotídica con mayor cobertura y porcentaje de identidad; esto permitió asignar las cepas aisladas a grupos taxonómicos genéricos.

Con base en dicha identificación se realizó un árbol filogenético utilizando la plataforma SILVA. Para ello se introdujeron las secuencias nucleotídicas del gen *ARNr 16S* obtenidas en un único archivo multifasta en *ACT: Alignment, Classification and Tree Service*. Posteriormente, se generó el árbol filogenético con ayuda del programa *RaxML* y utilizando *GTR* como modelo de sustitución de nucleótidos. Posteriormente, el árbol fue editado gráficamente utilizando el programa *TreeView* (Beccati et al., 2017) y el editor gráfico *Inkscape* (Inkscape Project, 2020).

Caracterización bioquímica *in silico* de las cepas bacterianas

Se utilizaron bases de datos de rutas metabólicas para indagar sobre diversas capacidades metabólicas de las bacterias aisladas y su posible participación en el metabolismo del nitrógeno y fósforo, sideróforos y biosíntesis de hormonas vegetales. Para ello se extrajeron las secuencias homólogas disponibles para otras especies bacterianas de la base de datos KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG; Kanehisa et al., 2023), de cada uno de los genes involucrados en cada ruta metabólica. Con estas secuencias, se realizaron nueve *BLAST* en NCBI para cada gen involucrado en las diferentes rutas. Si el gen no estaba presente, se realizó un *BLAST* de la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen, en la plataforma The UniProt Consortium (Uniprot). Los parámetros a seguir en NCBI fueron los siguientes (Pruitt et al., 2012):

- RefSeq: Genomas representativos optimizados para secuencias altamente similares (megablastos)
- RefSeq Genomas representativos optimizados para secuencias más disímiles (megablastos no contiguos)
- Contigs del genoma completo optimizado para secuencias algo similares (blastn)
- Contigs del genoma completo optimizado para secuencias más disímiles (megablastos no contiguos)
- Contigs del genoma completo optimizado para secuencias altamente similares (megablastos)
- RefSeq Base de datos del genoma optimizado para secuencias algo similares (blastn)
- RefSeq Base de datos del genoma optimizado para secuencias más disímiles (megablastos no contiguos)
- RefSeq Base de datos del genoma optimizado para secuencias altamente similares (megablastos)
- RefSeq Genomas representativos optimizados para secuencias algo similares (blastn)

Todo esto nos permitió explorar el posible rol ecológico de estas cepas en el desarrollo de la sucesión primaria en curso, tras la desaparición del glaciar. Adicionalmente, esto facilitó la identificación de cepas bacterianas potencialmente promotoras del crecimiento vegetal.

Resultados

Aislamiento de cepas bacterianas presentes en las biocostras y caracterización cultural

A partir de cinco réplicas de muestras de biocostras inoculadas en los medios de cultivo líquidos, así como también rastrillados sobre medios agarizados, se obtuvieron en total 39 aislados bacterianos, seleccionando aquellos que fueran culturalmente diferentes. El crecimiento de las cepas se llevó a alrededor de 5 °C. Estos aislados fueron purificados siguiendo el procedimiento indicado en la sección de Materiales y Métodos, y se conservaron en estado axénico a -20°C en glicerol al 40%. Los aislados fueron nombrados en la serie “K” seguido de un número (K1, K2, K3, K4...). Estos presentaron en su mayoría atributos diferentes de forma, textura, superficie, consistencia, borde, pigmentación y opacidad, siguiendo la caracterización de Smibert & Krieg (1994; Tabla 2). En la Figura S1 se presenta un catálogo de fotografías de las colonias de las distintas cepas.

Tabla 2. Caracterización cultural de las cepas aisladas a partir de las biocostras a 5°C.

Nombre del aislado bacteriano (colonia)	Forma	Textura	Superficie	Consistencia	Borde	Pigmentación	Opacidad
K1	Circular	Brillante	Planoconvexa	Viscosa/cremosa	Redondeado	Blanca	Opaca
K2	Circular	Brillante	Convexa	Viscosa/cremosa	Redondeado	Naranja	Traslúcida
K3.1	Circular	Brillante	Planoconvexa	Viscosa/cremosa	Redondeado	Blanca amarillenta	Opaca
K3.2	Circular	Brillante	Planoconvexa	Viscosa/cremosa	Redondeado	Naranja amarillenta	Opaca
K4	Circular	Brillante	Convexa	Viscosa/cremosa	Redondeado	Blanca cremosa	Opaca
K5	Circular	Brillante	Planoconvexa	Mucoide	Redondeado	Blanca amarillenta	Traslúcida
K6	Circular	Brillante	Convexa	Viscosa/cremosa	Redondeado	Blanca cremosa	Opaca
K7.1	Circular	Brillante	Planoconvexa	Viscosa/cremosa	Redondeado	Naranja	Opaca/traslúcida

K7.2	Circular	Brillante	Plana	Viscosa/ cremosa	Redondeado	Blanca	Opaca
K8	Circular	Brillante	Convexa	Viscosa/ cremosa	Redondeado	Blanca rosáea	Opaca
K9	Circular	Brillante	Acuminada	Viscosa/ cremosa	Redondeado	Blanca cremosa	Opaca
K10	Circular	Brillante/ mate	Planoconvexa	Viscosa/ cremosa	Redondeado	Naranja brillante	Traslúcida
K11	Circular	Brillante	Acuminada/ convexa	Viscosa/ cremosa/ mucoide	Redondeado	Crema amarillenta	Traslúcida
K12	Circular	Mate	Planoconvexa	Seca	Redondeado / espiculado	Naranja brillante	Opaca
K13	Circular	Brillante	Planoconvexa (muy aplastada)	Cremosa	Redondeado	Blanca cremosa	Muy traslúcida
K14	Circular	Brillante	Convexa	Cremosa	Redondeado	Blanca amarillenta	Traslúcida
K15	Circular	Brillante	Convexa	Viscosa/ cremosa	Redondeado	Blanca rosáea	Opaca
K16	Circular	Mate	Muy convexa	Viscosa/ cremosa	Redondeado	Blanca rosáea	Opaca
K17	Circular	Brillante	Acuminada	Viscosa/ cremosa	Redondeado	Blanca cremosa	Opaca
K18	Circular	Brillante/ mate	Planoconvexa	Viscosa/ cremosa	Redondeado	Naranja brillante	Traslúcida
K19	Circular	Brillante	Planoconvexa	Mucoide	Circular/ ondulado	Amarilla	Opaca
K20	Circular	Brillante	Planoconvexa	Mucoide	Circular/ ondulado	Amarilla	Opaca
K21	Circular	Brillante	Planoconvexa	Mucoide	Circular/ ondulado	Amarilla	Opaca
K22	Circular	Brillante	Plana	Mucoide	Redondeado	Blanca	Traslúcida

						amarillenta	
K23	Circular	Brillante	Planoconvexa	Viscosa/ cremosa	Redondeado	Blanca	Opaca
K24	Circular	Mate/ rugoso	Acuminada	Creмоса	Espiculado	Naranja intensa oscura	Opaca
K25	Circular	Brillante	Convexa	Seca	Redondeado	Naranja brillante	Opaca
K26	Circular	Brillante	Planoconvexa (muy plana)	Mucoide	Redondeado	Blancuzca transparente	Transparente
K27	Circular	Brillante	Convexa/ acuminada	Creмоса	Redondeado	Blanca cremosa	Opaca
K28	Circular	Brillante	Convexa/ acuminada	Creмоса	Redondeado	Blanca cremosa	Opaca
K29	Circular	Brillante	Convexa/ acuminada	Creмоса	Redondeado	Blanca amarillenta	Opaca
K30	Circular	Brillante	Planoconvexa	Creмоса/ pegajosa	Redondeado	Crema amarillenta	Traslúcida
K31	Circular	Brillante	Convexa	Seca	Redondeado	Blanca	Opaca/ levemente traslúcida
K32	Circular	Brillante	Planoconvexa	Creмоса/ pegajosa	Redondeado	Crema amarillenta	Traslúcida
K33	Circular	Brillante	Planoconvexa	Creмоса/ pegajosa	Redondeado	Crema amarillenta	Traslúcida
K34	Circular/ levemente irregular	Mate/ rugosa granulada	Planoconvexa	Creмоса	Lobulado/ espiculado	Salmonada	Opaca
K35	Circular/ levemente irregular	Mate/ rugosa granulada	Planoconvexa	Creмоса	Lobulado/ espiculado	Salmonada	Opaca
K36	Circular	Brillante	Convexa	Creмоса/ mucoide	Ligeramente acuminado	Blanca salmonada	Opaca
K37	Circular	Brillante	Convexa	Creмоса/ mucoide	Ligeramente acuminado	Rosada	Opaca

Identificación de las cepas con el marcador molecular *ARNr 16S*

Para cada uno de los aislados axénicos, se hizo una PCR de colonia utilizando cebadores universales para bacterias (fD1 y rD1; Weisburg et al. 1991) del gen *ARNr 16S*. Se obtuvieron en total 28 secuencias de nucleótidos (todas ellas en el sentido 5'-3'), es decir, una para cada cepa aislada. Estas fueron procesadas manualmente para editar o eliminar regiones con dobles picos o poco claras. Mediante una prueba de *BLAST* en la plataforma NCBI, se identificaron las cepas hasta el nivel de género. Esta identificación se hizo con base en el valor de E y su % de identidad. Se encontraron siete géneros bacterianos diferentes: *Arthrobacter*, *Cryobacterium*, *Frontrahabitans*, *Paenarthrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* y *Sphingomonas* (Tabla 3). En la Tabla 3 se muestra el porcentaje de identidad de las dos primeras especies encontradas en el *BLAST* para cada una de las cepas estudiadas.

Tabla 3. Identificación a nivel de género y especie de las cepas aisladas de la biocostra. Se muestran los géneros bacterianos a los que pertenece cada cepa y las dos primeras especies encontradas en el BLAST. Para cada una se muestra el porcentaje de identidad.

Cepa	Género	Especie	% de identidad
K1	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter ginsengisoli</i>	99,67%
		<i>Arthrobacter oryzae</i>	99,67%
K2	<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas glacialis</i>	99,84%
		<i>Sphingomonas qilianensis</i>	98,52%
K3-1	<i>Cryobacterium</i>	<i>Cryobacterium breve</i>	98%
		<i>Leifsonia kafniensis</i>	97,83%
K3-2	<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas glacialis</i>	99,20%
		<i>Sphingomonas qilianensis</i>	98,23%
K4	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter oryzae</i>	99,62%
		<i>Arthrobacter ginsengisoli</i>	99,75%
K6	<i>Paenarthrobacter</i>	<i>Paenarthrobacter nicotinovorans</i>	98,85%
		<i>Paenarthrobacter histidinolovorans</i>	98,41%
K7-2	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas canavanivorans</i>	100%
		<i>Pseudomonas bijjeensis</i>	100%

K8	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter ginsengisoli</i>	94,08%
		<i>Arthrobacter oryzae</i>	92,53%
K9	<i>Paenarthrobacter</i>	<i>Paenarthrobacter nicotinovorans</i>	99,06%
		<i>Paenarthrobacter histidinovorans</i>	98,71%
K10	<i>Fronidhabitans</i>	<i>Fronidhabitans sucicola</i>	98,45%
		<i>Fronidhabitans australicus</i>	98,32%
K11	<i>Cryobacterium</i>	<i>Cryobacterium breve</i>	98,90%
		<i>Cryobacterium psychrotolerans</i>	99,11%
K14	<i>Cryobacterium</i>	<i>Cryobacterium breve</i>	98,84%
		<i>Leifsonia kafniensis</i>	98,84%
K15	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter humicola</i>	100%
		<i>Arthrobacter oryzae</i>	100%
K16	<i>Rhodococcus</i>	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	100%
		<i>Rhodococcus qingshengii</i>	100%
K18	<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas faeni</i>	99,79%
		<i>Sphingomonas aurantiaca</i>	99,26%
K19	<i>Fronidhabitans</i>	<i>Fronidhabitans sucicola</i>	98,61%
		<i>Fronidhabitans australicus</i>	98,50%
K20	<i>Fronidhabitans</i>	<i>Fronidhabitans sucicola</i>	98,15%
		<i>Fronidhabitans australicus</i>	98,15%
K21	<i>Fronidhabitans</i>	<i>Fronidhabitans sucicola</i>	97,98%
		<i>Fronidhabitans australicus</i>	97,98%
K23	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter ginsengisoli</i>	95,38%

		<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	95,22%
K24	<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas faeni</i>	99,75%
		<i>Sphingomonas aerolata</i>	99,13%
K25	<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas glacialis</i>	99,88%
		<i>Sphingomonas psychrolutea</i>	98,88%
K27	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter oryzae</i>	100%
		<i>Arthrobacter ginsengisoli</i>	99,7%
K30	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas canavaninivorans</i>	99,42%
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99,30%
K32	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas canavaninivorans</i>	99,35%
		<i>Pseudomonas asturiensis</i>	99,35%
K33	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas canavaninivorans</i>	99,02%
		<i>Pseudomonas canadensis</i>	99,02%
K34	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99,88%
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99,88%
K36	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas allivorans</i>	100%
		<i>Pseudomonas yamanorum</i>	100%
K37	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas canavaninivorans</i>	99,17%
		<i>Pseudomonas canadensis</i>	99,17%

En la Figura 10 se muestran las relaciones evolutivas entre las cepas de estudio (en negritas y con nodos resaltado en azul claro) y las cepas bacterianas con mayor similitud a nivel de la secuencia del gen *ARNr 16S*, disponibles en las bases de datos de SILVA. Se observa una asignación clara a nivel de género (círculo externo de la Figura 10).

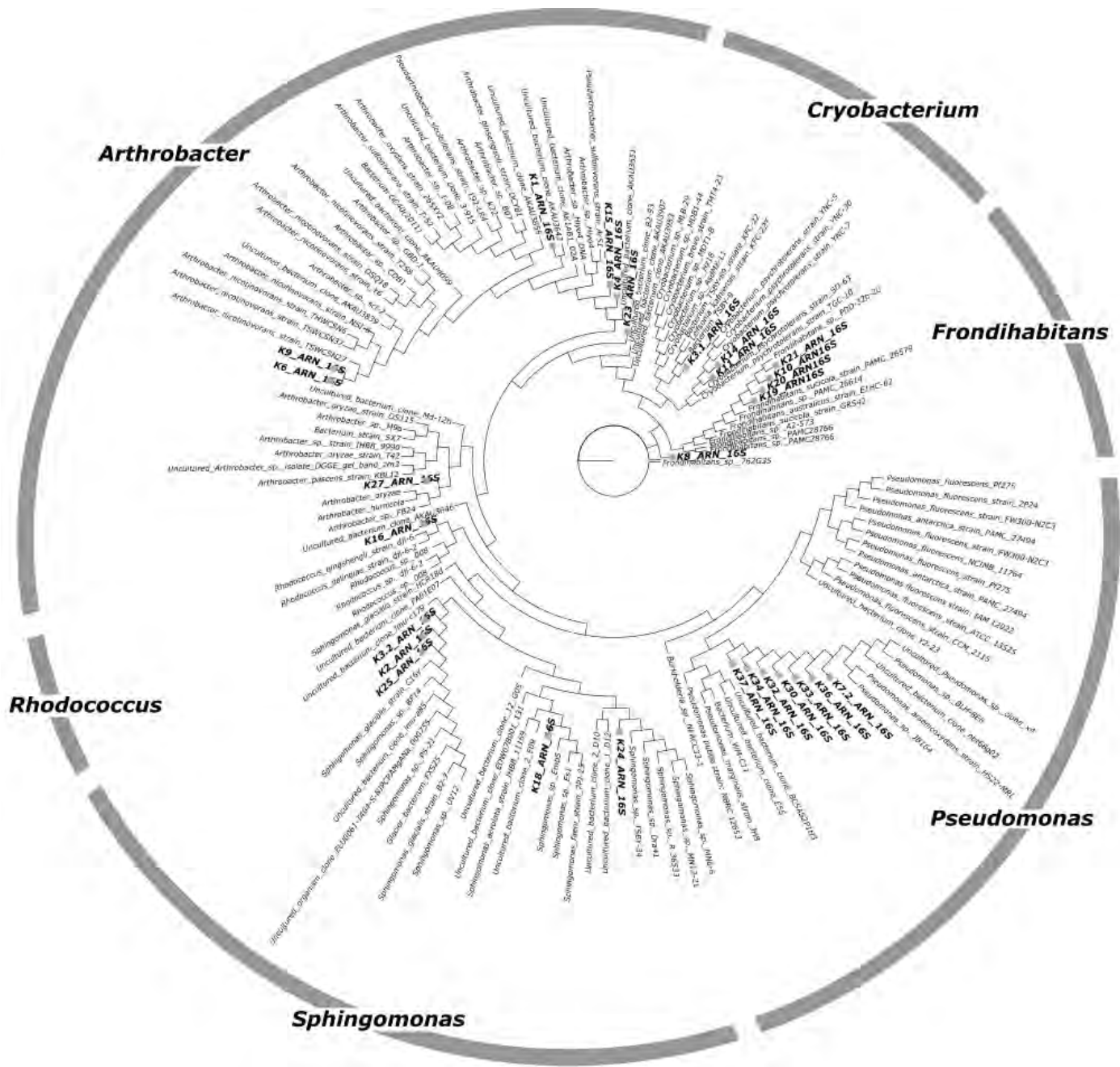
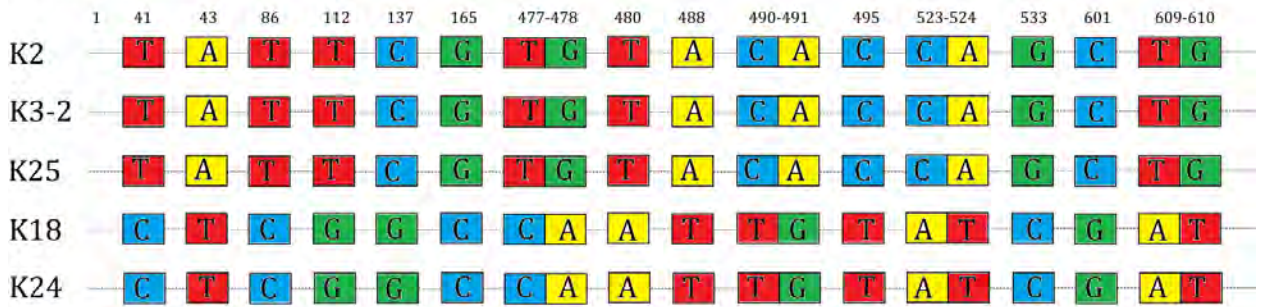


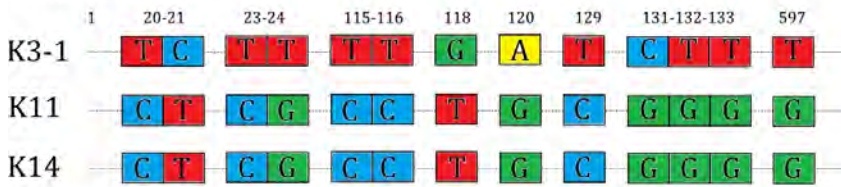
Figura 10. Posición filogenética de las cepas aisladas mediante análisis del gen ARNr 16S. Se muestra un árbol radial, y se realizan con pequeños cuadrados azules los nodos de las cepas estudiadas en el presente estudio, con sus nombres en negrita. En el círculo externo se muestra la identificación a nivel de género.

En la Figura 11 se muestran los polimorfismos (mutaciones) puntuales que se encontraron entre las secuencias de 16S de las cepas pertenecientes a cinco de los siete géneros estudiados (no se encontraron polimorfismos en el seno de los géneros *Frondihabitans* y *Rhodococcus*).

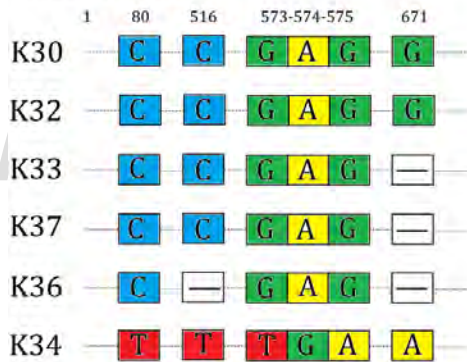
Sphingomonas



Cryobacterium



Pseudomonas



Arthrobacter y Paenarthrobacter

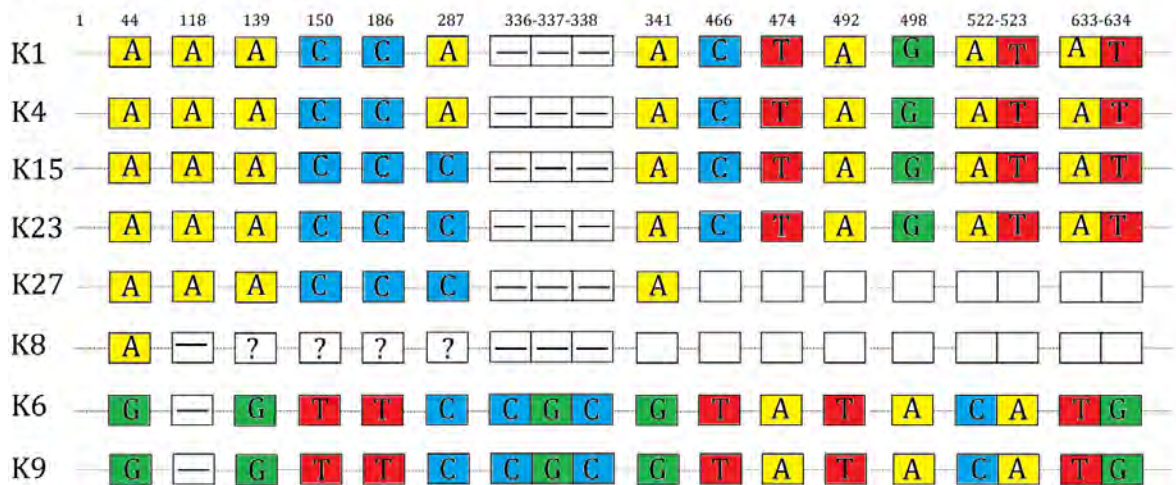


Figura 11. Polimorfismos puntuales presentes en las secuencias estudiadas. Se muestran los polimorfismos puntuales encontrados en las secuencias obtenidas para el gen 16S por género estudiado. En la parte superior se indica la posición del nucleótido correspondiente y a la izquierda el nombre de la cepa a la que pertenece dicha secuencia. Las letras presentes en los recuadros indican los nucleótidos correspondientes por secuencia. A= adenina, C=citosina, G=guanina y T= timina. Los recuadros blancos corresponden a regiones donde no hay más nucleótidos en la secuencia, los que tienen un signo de interrogación corresponden a dobles picos (dos nucleótidos diferentes en una misma posición) y los que presentan una línea horizontal, a deleciones.

Identificación *in silico* de genes funcionales de la ruta del fósforo en los géneros estudiados

Utilizando las secuencias homólogas encontradas en la base de datos KEGG para cada uno de los genes involucrados en las diferentes rutas metabólicas estudiadas, se llevaron a cabo 8.640 *BLAST* en la plataforma NCBI (en total se blastearon 160 genes para cada uno de los géneros bacterianos). Si en esta plataforma no se encontraban resultados, se hacía un *BLAST* en Uniprot con la secuencia homóloga (en aminoácidos) correspondiente al gen codificado. De esta manera, se reconstruyeron las dos rutas metabólicas mencionadas para seis de los siete géneros bacterianos diferentes. Para el género *Paenarthrobacter* las búsquedas no han podido llevarse a cabo con el mismo procedimiento, debido a que no existen secuencias en NCBI reportadas a nivel de género.

Las bacterias presentes en el suelo pueden hacer el fósforo disponible para las plantas mediante dos procesos principales, solubilización del fósforo inorgánico y mineralización del fósforo orgánico.

Solubilización de fósforo inorgánico

El proceso de solubilización de fósforo es mediado principalmente por la liberación de ácidos orgánicos por parte de las bacterias del suelo. La síntesis de ácido glucónico ha sido uno de los procesos más estudiados. Este ácido es sintetizado en la vía de las pentosas fosfato como un intermediario de reacción. Entre las enzimas involucradas en la síntesis del ácido glucónico destacan la quinoproteína glucosa deshidrogenasa (codificada por el gen *gcd*) y la enzima gluconato deshidrogenasa (codificada por el gen *gnl*). Sin embargo, otros genes como *gdh*, *hox*, *gdh2*, *gld* y *ssgdh* codifican para enzimas que utilizan *D*-glucosa (o β -*D*-glucosa) y permiten la síntesis de ácido glucónico.

De los géneros estudiados aquí, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter* y *Rhodococcus* tienen el potencial genético para solubilizar fósforo, ya que poseen los genes necesarios para completar la ruta. El género *Cryobacterium* carece del gen *gnl* lo que hace que no pueda completar dicha ruta; igualmente, *Frontrhizobium* no exhibe el gen *gcd*.

En la Tabla 4 se muestra la ausencia o presencia de los genes involucrados en la síntesis de ácido glucónico a partir de la glucosa.

Tabla 4. Presencia (1) o ausencia (0) de los genes involucrados en la síntesis de ácido gluconico para cada uno de los géneros estudiados. Se muestran los sustratos utilizados por cada una de las enzimas codificadas por dichos genes y sus productos. Los nombres de los géneros se resumen así: A=Arthrobacter, S=Sphingomonas, F=Frondihabitans, C=Cryobacterium, R=Rhodococcus, Ps=Pseudomonas.

Sustrato/producto	Gen	A	S	F	C	R	Ps
β -D-glucosa	<i>hox</i>	0	0	0	0	0	0
a							
D-glucono-1,5-lactona							
	<i>Gdh</i>	1	1	0	1	0	1
D-glucosa	<i>gcd</i>	1	1	0	1	1	1
a							
D-glucono-1,5-lactona							
	<i>Gdh2</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>Gld</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>Ssgdh</i>	0	0	0	0	0	0
D-glucono-1,5-lactona	<i>gnl</i>	1	1	1	0	1	1
a							
D-gluconato							
D-glucanato	K06151	1	1	1	1	1	1
a							
2-dehidro-D-gluconato							
	<i>ghrB</i>	1	1	1	1	1	1

En la Figura 12 se muestra esquemáticamente la capacidad de síntesis de ácido gluconico de los géneros *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter* y *Rhodococcus*.

- 1= *Arthrobacter* spp.
- 2= *Cryobacterium* spp.
- 3= *Pseudomonas* spp.
- 4= *Rhodococcus* spp.
- 5= *Sphingomonas* spp.
- 6= *Frontridhabitans* spp.

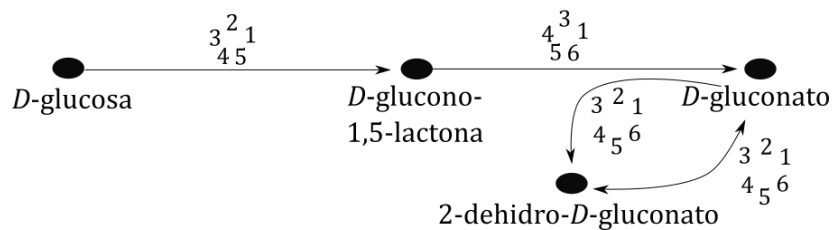


Figura 12. Participación de los géneros estudiados en la solubilización de fósforo. Los círculos negros indican los sustratos y productos de las subreacciones, las flechas negras indican el sentido de la reacción y los números representan el(los) género(s) que poseen los genes para completar la reacción.

Mineralización de fósforo orgánico

La mineralización del fósforo orgánico por parte de las bacterias del suelo es llevada a cabo mediante reacciones enzimáticas catalizadas por enzimas codificadas por genes (mostrados entre paréntesis) como son la fosfatasa ácida (*phoN*), fosfatasa alcalina (*phoD*), fosfonatasa (*phnX*), fitasa (*appA*), y CP liasa (*phnJ*). Algunos de estos genes forman parte del regulón *pho*, y están controlados por un sistema de regulación que comprende una proteína sensora de histidina quinasa (*phoR*) y un regulador de respuesta transcripcional (*phoB*).

De los géneros estudiados aquí, todos tienen capacidad mineralizadora de fósforo. En la Tabla 5 se muestra la presencia o ausencia de estos genes en los géneros estudiados.

Tabla 5. Presencia (1) o ausencia (0) de los genes involucrados en la mineralización de fósforo. Se muestran los sustratos utilizados por cada una de las enzimas codificadas por dichos genes y sus productos. Los nombres de los géneros se resumen así: A=*Arthrobacter*, S=*Sphingomonas*, F=*Frontridhabitans*, C=*Cryobacterium*, R=*Rhodococcus*, Ps=*Pseudomonas*.

Sustrato/ Producto	Gen	A	S	F	C	R	Ps
Rivoflavina-5-fosfato a rivoflavina	<i>phoN</i>	0	0	0	0	0	1
7,8-dihidroneopterin-3-trifosfato a 7,8-dihidroneopterin	<i>phoD</i>	1	1	0	1	1	1
<i>D</i> -ribosa-1-metilfosfonato-5-fosfato a <i>D</i> -ribosa-1,2-ciclofosfato-5-fosfato	<i>phnJ</i>	1	1	1	1	1	1
Fosfonoacetaldehído a acetaldehído	<i>phnX</i>	1	1	0	0	0	1
Fitato a inositol-1,2,3,5,6-pentakisfosfato	<i>appA</i>	0	0	0	0	0	1

Proteína reguladora del regulón <i>pho</i>	<i>phoB</i>	1	1	0	0	0	1
Regulón de fosfato: sensor histidina quinasa	<i>phoR</i>	0	0	0	1	0	1

En la Tabla 6 se muestra la presencia y ausencia de dos transportadores de fosfato (*pitA* y *pstS*) en las bacterias estudiadas.

Tabla 6. Presencia (1) o ausencia (0) de los genes involucrados en el transporte de fosfato en bacterias para cada uno de los géneros estudiados. Se muestran los sustratos utilizados por cada una de las enzimas codificadas por dichos genes y sus productos. Los nombres de los géneros se resumen así: A=Arthrobacter, S=Sphingomonas, F=Frontrihabitans, C=Cryobacterium, R=Rhodococcus, Ps=Pseudomonas.

Sustrato/ Producto	Gen	A	S	F	C	R	Ps
Transportadores de fósforo	<i>pitA</i>	1	1	0	0	1	1
	<i>pstS</i>	1	1	0	1	1	1

La capacidad potencial de mineralización y solubilización en los diferentes géneros aislados a partir de biocostras se resume en la Tabla 7 y la Figura 13. Se determinó que todos los géneros estudiados poseen genes que codifican enzimas involucradas en el proceso de mineralización. Sin embargo, la solubilización se ve restringida a los géneros *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas* y *Pseudomonas*.

Tabla 7. Géneros bacterianos capaces de completar (sí) o no (no) los procesos de solubilización y mineralización. Los nombres de los géneros se resumen así: A=Arthrobacter, S=Sphingomonas, F=Frontrihabitans, C=Cryobacterium, R=Rhodococcus, Ps=Pseudomonas.

Substrato	A	S	F	C	R	Ps
Solubilización	sí	sí	no	no	sí	sí
Mineralización	sí	sí	sí	sí	sí	sí

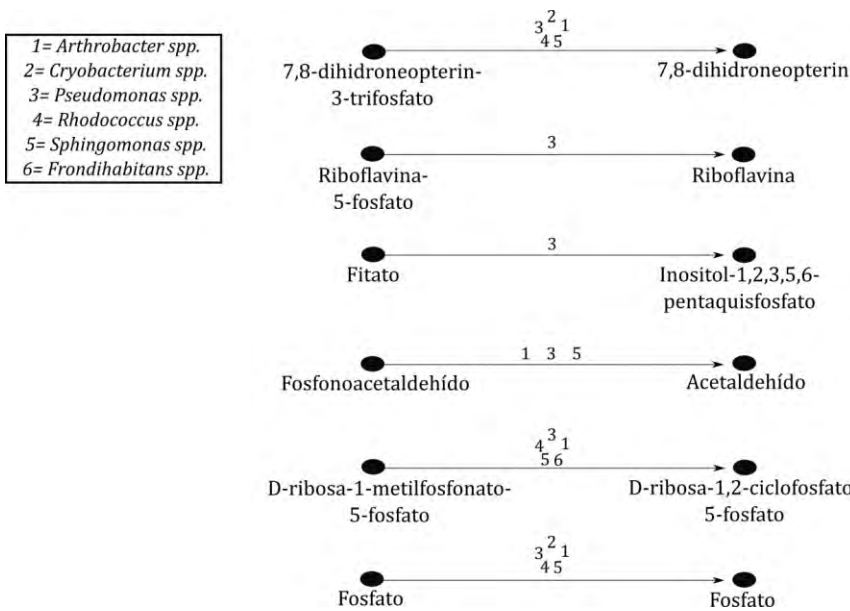


Figura 13. Participación de los géneros estudiados en la mineralización de fósforo. Los círculos negros indican los sustratos y productos de las subreacciones, las flechas negras indican el sentido de la reacción y los números representan el(los) género(s) que poseen los genes para completar la reacción.

Identificación *in silico* de genes funcionales de la ruta del nitrógeno en los géneros estudiados

En la Tabla 8 se muestran cada uno de los genes implicados en la ruta global del nitrógeno.

Tabla 8. Presencia (1) o ausencia (0) de los genes de las principales vías metabólicas de la ruta del nitrógeno por género bacteriano aislado a partir de biocostras. Se muestran los genes implicados en cada una de las subrutinas del nitrógeno para cada uno de los géneros estudiados. Los nombres de los géneros se resumen así: A=*Arthrobacter*, S=*Sphingomonas*, F=*Frontridhabitans*, C=*Cryobacterium*, R=*Rhodococcus*, Ps=*Pseudomonas*.

Ruta / género bacteriano	Gen	A	S	F	C	R	Ps
Reducción de nitrato desasimilatoria	<i>narGHI</i>	1	1	0	1	1	1
	<i>napAB</i>	0	1	0	0	0	1
	<i>nirBD</i>	1	1	0	1	1	1
	<i>nrfAH</i>	0	0	0	0	0	1
Reducción de nitrato asimilatoria	<i>narB</i>	0	0	0	0	0	1
	<i>nR</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>nasAB</i>	0	1	0	0	1	1

	<i>nit6</i>	1	1	0	1	1	1
	<i>nirA</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>nasBDE</i>	1	1	0	1	1	1
Desnitrificación	<i>narGHI</i>	1	1	0	1	1	1
	<i>napAB</i>	0	0	0	0	0	1
	<i>nirK</i>	0	1	0	1	1	1
	<i>nirS</i>	0	0	0	1	1	1
	<i>norBC</i>	0	1	0	0	1	1
	<i>nosZ</i>	0	1	0	1	1	1
Fijación de nitrógeno	<i>nifDKH</i>	0	1	0	0	0	1
	<i>anfG</i>	0	1	0	0	0	0
	<i>vnfDKGH</i>	0	0	0	0	0	0
Nitrificación	<i>nxrAB</i>	1	1	0	1	1	1
	<i>hao</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>amoCAB</i>	0	1	0	0	0	0
Anammox	<i>nirK</i>	0	1	0	1	1	1
	<i>nirS</i>	0	0	0	1	1	1
	<i>hzs</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>hdh</i>	0	0	0	0	0	1

En la Tabla S1 se muestran cada uno de los sustratos y productos sintetizados por las enzimas codificadas por los genes involucrados en la ruta del nitrógeno. Además de las vías ya mencionadas, en la Tabla 8 se muestran genes involucrados en transformaciones adicionales de la molécula de nitrógeno.

El ciclaje del nitrógeno puede iniciar con el proceso de fijación de nitrógeno molecular hasta amonio, por bacterias fijadoras de nitrógeno. De los géneros encontrados, sólo *Pseudomonas* y *Sphingomonas* presentan el operón *nifDKH* que codifica para la enzima Nitrogenasa implicada en el proceso de fijación. El nitrógeno atmosférico así fijado, es transformado hasta nitrito por bacterias del tipo nitrificantes. Ninguno de los géneros registrados presenta los genes implicados

en esta subruta. Sin embargo, *Sphingomonas* y *Rhodococcus* exhiben el gen *amoCAB* y todos los géneros, excepto *Fronidhabitans*, exhiben el gen *nxrAB* que se encuentra implicado en la reducción del nitrito hasta el nitrato en esta subruta (Tabla 8).

Aunque algunos de los géneros no son capaces de reducir el amonio presente en el suelo hasta nitrato, algunos sí parecen ser capaces de incorporar el nitrato y el nitrito extracelular del medio hacia la célula. Los géneros *Arthrobacter*, *Cryobacterium*, *Pseudomonas* y *Rhodococcus* lo podrían hacer debido a que presentan genes como el *nrt* (Tabla S1), que codifica un transportador de nitrato de la familia MFS. Todos los géneros estudiados son capaces de reducir el nitrato hasta nitrito, pues exhiben genes como el *narB*, *narG*, *nr* o *napA*.

Otro de los procesos importantes detectados en el ciclado de este nutriente es la capacidad de los géneros *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* y *Sphingomonas* para tomar otros sustratos como el nitroalcano y transformarlo en nitrito, debido a que presentan genes como *ncd2* o *NAO* (Tabla S1). El nitrito así incorporado puede ser metabolizado para devolver el nitrógeno molecular a la atmósfera, lo que las bacterias hacen por la vía de la desnitrificación. En la búsqueda de los genes implicados en la desnitrificación, encontramos que todos los géneros, excepto *Fronidhabitans*, son capaces de devolver el nitrógeno a la atmósfera, ya que exhiben genes como *narGHI*, *nirK*, *norBC* y *nosZ*.

Así mismo, algunos de los géneros estudiados son capaces de otorgar amonio al suelo por rutas alternativas a la fijación de nitrógeno atmosférico; todos ellos, excepto *Fronidhabitans*, pueden tomar formamida del medio e incorporar amonio al suelo. De manera alternativa, puede ocurrir la incorporación de nitrilo, como se registró en *Pseudomonas* y *Rhodococcus*. Finalmente, tal como se observa en la Tabla S1, todos los géneros estudiados son capaces de tomar el amonio del suelo y utilizarlo para llevar a cabo la síntesis de aminoácidos esenciales como glutamato o arginina (para arginina, sólo *Arthrobacter* posee el gen *cpsI*).

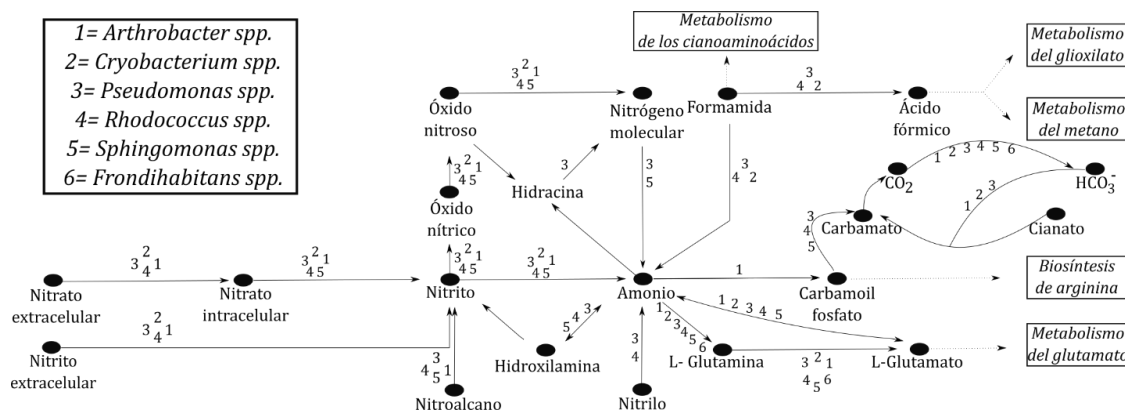


Figura 14. Participación de los géneros estudiados en el ciclo global del nitrógeno. Los círculos negros indican los sustratos y productos de las subreacciones, las flechas negras indican el sentido de la reacción y los números representan el(los) género(s) que poseen los genes para completar la reacción.

En la Figura 14 y en la Tabla 9 se muestra la capacidad o incapacidad de llevar a cabo cada una de las subrutas del ciclo global del nitrógeno para cada género bacteriano estudiado.

Tabla 9. Géneros bacterianos capaces de completar (sí) o no (no) las diferentes subrutas del nitrógeno. Los nombres de los géneros se resumen así: A=Arthrobacter, S=Sphingomonas, F=Fronidhabitans, C=Cryobacterium, R=Rhodococcus, Ps=Pseudomonas.

Subruta	A	S	F	C	R	Ps
Reducción de nitrato desasimilatoria	sí	sí	no	sí	sí	sí
Reducción de nitrato asimilatoria	no	sí	no	no	sí	sí
Desnitrificación	sí	sí	no	sí	sí	sí
Fijación de nitrógeno	no	sí	no	no	no	sí
Nitrificación	no	no	no	no	no	no
Anammox	no	no	no	no	no	no

Identificación *in silico* de genes implicados en la síntesis de sideróforos en los géneros estudiados

En bacterias, la síntesis de sideróforos es llevada a cabo a partir de péptidos sintasas no ribosómicas. La ruta de síntesis de sideróforos parte del corismato sintetizado en las vías metabólicas de aminoácidos esenciales como fenilalanina, tirosina y triptófano. El corismato así sintetizado sufre un proceso de isomerización por parte de la enzima isocorismato sintasa codificada por el gen *pchA*. Este isocorismato es el sustrato de una gran variedad de enzimas (codificadas por los genes mostrados en la tabla S2) que permiten la síntesis de siete tipos diferentes de sideróforos (Kanehisa et al., 2023).

En la Tabla S2 se muestran los sustratos y productos utilizados por las enzimas necesarias para la síntesis de los sideróforos pioquelina, micobactina, yersiniabactina, vibriobactina, enteroquelina, mixoquelina, bacilobactina y petrobactina. De los géneros bacterianos estudiados, sólo *Arthrobacter*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus* y *Pseudomonas* completan la síntesis de algunos de los sideróforos mencionados arriba. En la Tabla 10 y Figura 15 se muestran los sideróforos sintetizados por los géneros bacterianos estudiados.

Tabla 10. Géneros bacterianos capaces de completar (sí) o no (no) la biosíntesis de los diferentes sideróforos estudiados. Los nombres de los géneros se resumen así: A=Arthrobacter, S=Sphingomonas, F=Frondihabitans, C=Cryobacterium, R=Rhodococcus, Ps=Pseudomonas.

Síntesis de sideróforo	A	S	F	C	R	Ps
Pioquelina	sí	sí	no	no	sí	sí
Micobactina	sí	sí	no	no	sí	sí
Yersiniabactina	no	sí	no	no	sí	sí
Vibriobactina	sí	sí	no	no	sí	sí
Enteroquelina	sí	sí	no	no	sí	sí
Baciliobactina	sí	sí	no	no	sí	sí
Mixoquelina	sí	sí	no	no	sí	sí
Petrobactina	no	no	no	no	no	no

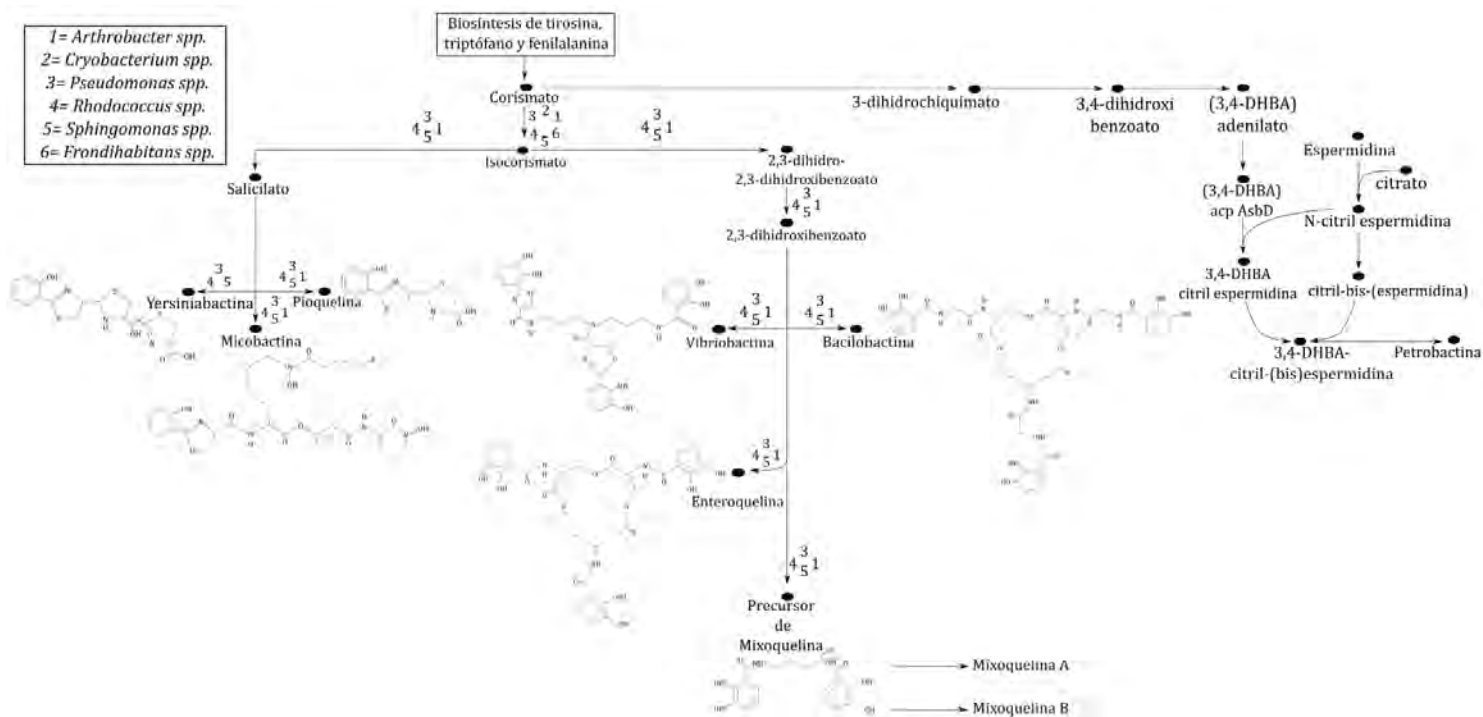


Figura 15. Participación de los géneros estudiados en la síntesis de sideróforos. Los círculos negros indican los sustratos y productos de las subreacciones, las flechas negras indican el sentido de la reacción y los números representan el(los) género(s) que poseen los genes para completar la reacción.

Identificación *in silico* de genes implicados en la síntesis de fitohormonas en los géneros estudiados

Biosíntesis de ácido indol-3-acético (AIA)

La biosíntesis del AIA es llevada a cabo a partir del aminoácido triptófano. Se conocen cinco rutas principales para la síntesis de dicha hormona.

Vía del ácido pirúvico

La subruta del ácido pirúvico inicia con la transformación del triptófano en indol-3-piruvato y de éste en ácido indol-3-acético. Ninguno de los géneros estudiados exhiben los genes implicados en esta ruta (Tabla 11).

Tabla 11. Presencia (1) o ausencia (0) de los genes involucrados en la vía del ácido pirúvico en cada uno de los géneros estudiados. Se muestran además los sustratos utilizados por cada una de las enzimas codificadas por dichos genes, y sus productos. Los nombres de los géneros se resumen así: A=Arthrobacter, S=Sphingomonas, F=Frondihabitans, C=Cryobacterium, R=Rhodococcus, Ps=Pseudomonas.

Sustrato/ Producto	Gen	A	S	F	C	R	Ps
Triptófano a indol-3-piruvato	<i>IL411</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>Tam1</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>TAA1</i>	0	0	0	0	0	0
Indol-3-piruvato a ácido indol-3- acético	<i>YUCCA</i>	0	0	0	0	0	0

Vía de la indol-3-acetamida

La ruta de la indol-3-acetamida inicia con la conversión del triptófano a indol-3-acetamida, y termina con el paso de ésta hasta indol-3-acetato. De las especies estudiadas, sólo *Pseudomonas* exhibe todos los genes involucrados en la ruta. Sin embargo, *Sphingomonas*, *Frondihabitans*, *Cryobacterium* y *Rhodococcus* exhiben el gen *amiE* que codifica la enzima EC.3.5.1.4 implicada en el paso de la indol-3-acetamida hasta indol-3-acetato (Tabla 12).

Tabla 12. Presencia (1) o ausencia (0) de los genes involucrados en la vía de la indol-3-acetamida en cada uno de los géneros estudiados. Se muestran los sustratos utilizados por cada una de las enzimas codificadas por dichos genes, y sus productos. Los nombres de los géneros se resumen así: A=Arthrobacter, S=Sphingomonas, F=Frondihabitans, C=Cryobacterium, R=Rhodococcus, Ps=Pseudomonas.

Sustrato/ Producto	Gen	A	S	F	C	R	Ps
Triptófano a indol-3- acetamida	<i>iaaM</i>	0	0	0	0	0	1
Indol-3- acetamida a indolacetato	<i>amiE</i>	0	1	1	1	1	1
	<i>iaaH</i>	0	0	0	0	0	1

Vía de la indolacetaldoxima

De todas las rutas de síntesis del ácido indol-3-acético, esta es una de las rutas menos caracterizada en bacterias. De las especies bacterianas registradas, sólo *Pseudomonas* exhibe el gen *CYP79B1_2* que codifica la enzima 1.14.14.156 involucrada en el paso del triptófano a la indolacetaldoxima. Sin embargo, la transformación del indolacetaldoxima hasta acetonitrilo por la enzima codificada por el gen *CYP71A13* no fue registrada para ninguno de los géneros estudiados (Tabla 13).

Tabla 13. Presencia (1) o ausencia (0) de los genes involucrados en la vía de la indolacetaldoxima en cada uno de los géneros estudiados. Se muestran además los sustratos utilizados por cada una de las enzimas codificadas por dichos genes y sus productos. Los nombres de los géneros se resumen así: A=Arthrobacter, S=Sphingomonas, F=Frondihabitans, C=Cryobacterium, R=Rhodococcus, Ps=Pseudomonas.

Sustrato/ Producto	Gen	A	S	F	C	R	Ps
Triptófano a indolacetaldoxima	<i>CYP79B1_2</i>	0	0	0	0	0	1
Indolacetaldoxima a indolacetonitrilo	<i>CYP71A13</i>	0	0	0	0	0	0
Indolacetonitrilo a indol-3-acetamida	<i>nthA</i>	1	1	0	0	1	1
Indol-3-acetamida a indol-3-acetato	<i>amiE</i>	0	1	1	1	1	1

	<i>iaaH</i>	0	0	0	0	0	1
Indolacetonitrilo a indol-3-acetato	<i>K01501</i>	0	1	0	0	1	1

Vía del indolacetaldehído

En esta ruta, sólo el género *Pseudomonas* posee la enzima 4.1.1.74 que es codificada por el gen *ipdC* involucrado en la síntesis de acetaldehído desde el indol-3-piruvato, y posteriormente hasta ácido indol-3-acético (Tabla 14).

Tabla 14. Presencia (1) o ausencia (0) de los genes involucrados en la vía de la indolacetaldehído en cada uno de los géneros estudiados. Se muestran además los sustratos utilizados por cada una de las enzimas codificadas por dichos genes y sus productos. Los nombres de los géneros se resumen así: A=Arthrobacter, S=Sphingomonas, F=Frondihabitans, C=Cryobacterium, R=Rhodococcus, Ps=Pseudomonas.

Sustrato/ Producto	Gen	A	S	F	C	R	Ps
Triptófano a indol-3-piruvato	<i>IL411</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>Tam1</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>TAA1</i>	0	0	0	0	0	0
Indol-3-piruvato a indol-3-acetaldehído	<i>ipdC</i>	0	0	0	0	0	1
	<i>ipdC</i>	0	0	0	0	0	0
Indol-3-acetaldehído a indol-3-acético	<i>ALDH</i>	1	1	1	1	1	1
	<i>AAOI_2</i>	0	0	0	0	0	0

Vía de la triptamina

La ruta de la triptamina sólo es llevada a cabo por el género *Pseudomonas*, ya que éste exhibe los genes que codifican las enzimas 4.1.1.28, 1.4.3.4 y 1.2.1.3 (Tabla 15).

Tabla 15. Presencia (1) o ausencia (0) de los genes involucrados en la vía de la triptamina para cada uno de los géneros estudiados. Se muestran los sustratos utilizados por cada una de las enzimas codificadas por dichos genes y sus productos. Los nombres de los géneros se resumen así: A=Arthrobacter, S=Sphingomonas, F=Frondihabitans, C=Cryobacterium, R=Rhodococcus, Ps=Pseudomonas.

Sustrato/ Producto	Gen	A	S	F	C	R	Ps
Triptófano a triptamina	<i>DDC</i>	0	0	0	0	0	1
	<i>TDC</i>	0	0	0	0	0	1
Triptamina a indol-3-acetaldehído	<i>AOCl</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>aofH</i>	0	0	0	0	1	1
Indol-3-acetaldehído a indol-3-acético	<i>ALDH</i>	1	1	1	1	1	1
	<i>AAOI_2</i>	0	0	0	0	0	0

La capacidad potencial de producir AIA en los diferentes géneros aislados a partir de biocostras se resume en la Tabla 16 y la Figura 16. Se puede observar que el género *Pseudomonas* parece completar la síntesis de AIA por dos vías alternativas.

Tabla 16. Géneros bacterianos capaces de completar (sí) o no (no) las diferentes subrutas de síntesis del AIA. Los nombres de los géneros se resumen así: A=Arthrobacter, S=Sphingomonas, F=Frondihabitans, C=Cryobacterium, R=Rhodococcus, Ps=Pseudomonas.

Subruta	A	S	F	C	R	Ps
Vía del ácido pirúvico	no	no	no	no	no	no
Vía de la indol-3-acetamida	no	no	no	no	no	sí
Vía de la indolacetaldoxima	no	no	no	no	no	no
Vía del indolacetaldehído	no	no	no	no	no	no
Vía de la triptamina	no	no	no	no	no	sí

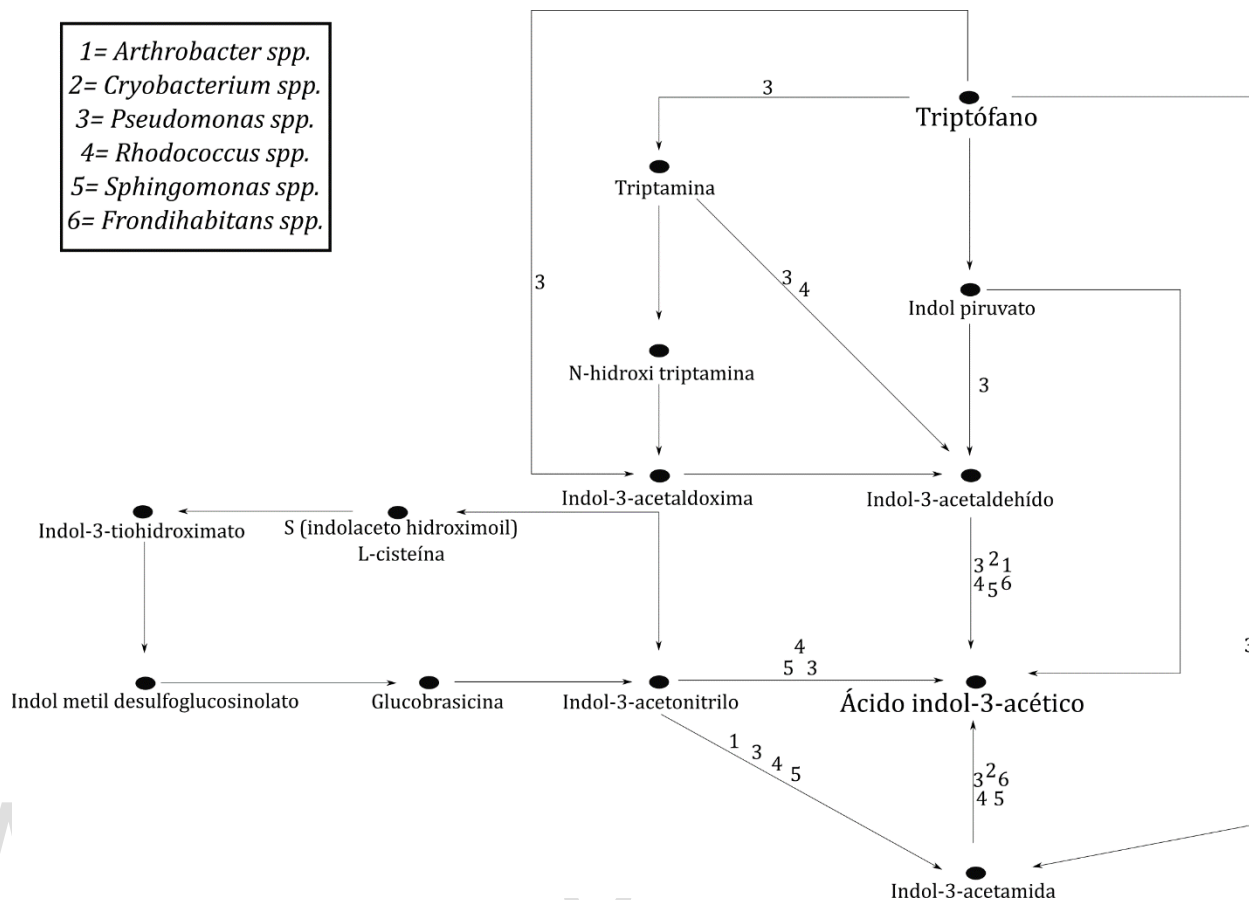


Figura 16. Participación de los géneros estudiados en la síntesis de ácido indol-3-acético (indol-3-acetato). Los círculos negros indican los sustratos y productos de las subreacciones, las flechas negras indican el sentido de la reacción y los números

Citoquinina

La zeatina es una citoquinina isoprenoide sintetizada por bacterias que promueve, en las plantas, procesos de diferenciación celular, formación de raíces, y formación de hojas. Aunque existen más de 30 citoquininas reportadas para bacterias, la zeatina es la más estudiada. La ruta de síntesis de la zeatina forma parte de la biosíntesis de terpenoides (Kanehisa et al., 2023).

Todos los géneros estudiados aquí son potencialmente capaces de completar la síntesis de cis-zeatina, ya que poseen el gen que codifica para la enzima dimetiltransferasa tARN encargada de tomar el DMAPP y transformarlo en Prenil-ARNt. Este producto, a su vez, es isomerizado sin acción enzimática para producir cis-zeatina. En la Tabla 17 y Figura 17 se muestra la presencia o ausencia de los genes involucrados en la síntesis de zeatina en los géneros estudiados.

Tabla 17. Presencia (1) o ausencia (0) de los genes involucrados en la síntesis de zeatina en bacterias para cada uno de los géneros estudiados. Se muestran los sustratos utilizados por cada una de las enzimas codificadas por dichos genes y sus productos. Los nombres de los géneros se resumen así: A=Arthrobacter, S=Sphingomonas, F=Frondihabitans, C=Cryobacterium, R=Rhodococcus, Ps=Pseudomonas.

Sustrato/ Producto	Gen	A	S	F	C	R	Ps
DMAPP a Isopentenil (ATP/ADP/AMP)	<i>IPT</i>	0	0	0	0	0	0
Isopentenil (ATP/ADP/AMP) a trans Zeatina ribósido (tri/di/mono fosfato)	<i>CYP735A</i>	0	0	0	0	0	0
DMAPP a Prenil-ARNt	<i>miaA</i>	1	1	1	1	1	1
Isopenteniladenina a adenina	<i>CKX</i>	0	0	0	0	0	0
Dihidrozeatina a dihidrozeatina-O-glucósido	<i>UGT73C</i>	0	0	0	0	0	0
Cis-zeatina a cis-zeatina-O-glucósido	<i>CISZOG</i>	0	0	0	0	0	0
Trans-zeatina a Lupinato	<i>ZOG1</i>	0	0	0	0	0	0
Trans-zeatina a trans-zeatina-7-B-D-glucósido	<i>UGT76C</i>	0	0	0	0	0	0
Trans-zeatina a O-B-D-xilozeatina	<i>ZOX1</i>	0	0	0	0	0	0

En la Tabla 18 se muestran los géneros capaces de completar la síntesis de zeatina.

Tabla 18. Géneros bacterianos capaces de completar (sí) o no (no) la biosíntesis de zeatina. Los nombres de los géneros se resumen así: A=Arthrobacter, S=Sphingomonas, F=Frondihabitans, C=Cryobacterium, R=Rhodococcus, Ps=Pseudomonas.

Ruta metabólica	A	S	F	C	R	Ps
Biosíntesis de zeatina	sí	sí	sí	sí	sí	sí

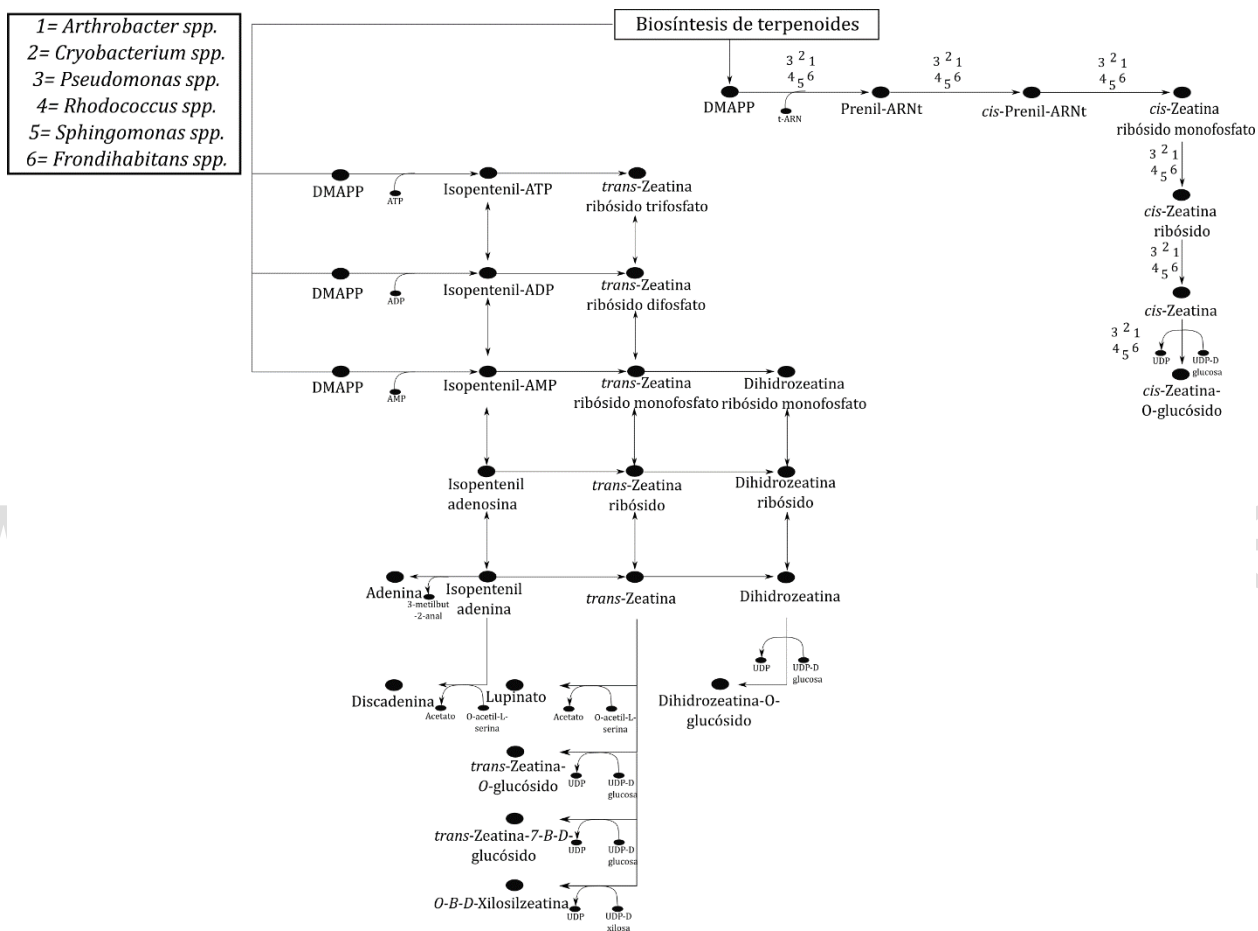


Figura 17. Participación de los géneros estudiados en la síntesis de zeatina. Los círculos negros indican los sustratos y productos de las subreacciones, las flechas negras indican el sentido de la reacción y los números representan el(los) género(s) que poseen los genes para completar la reacción.

Giberelinas

La vía de síntesis de giberelinas en bacterias inicia con la adición de un grupo COOH al *ent*-kaureno para formar ácido *ent*-kaurenoico, el cual sufre una serie de transformaciones químicas para producir GA12. A partir de GA12 se lleva a cabo la síntesis de GA9, GA4, GA1, GA7 y GA3.

En la Tabla 19 se muestra la presencia o ausencia de los genes implicados en dicha ruta para los géneros estudiados. Aunque los géneros *Arthrobacter*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus*,

Cryobacterium y *Pseudomonas* poseen los genes involucrados en la transformación de *ent*-kaureno a ácido *ent*-kaurenoico, no se detectó la presencia de los genes *KS* y *CPS* que actúan aguas arriba en esta vía metabólica. Sin embargo, registramos la presencia del gen *GGPS* en algunos géneros (*Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*) que codifica una geraniltranstransferasa involucrada en el primer paso de dicha vía, donde transforma precursores de isoprenoides en GGPP.

Tabla 19. Géneros bacterianos capaces de completar (sí) o no (no) la biosíntesis de giberelinas. Los nombres de los géneros se resumen así: A=*Arthrobacter*, S=*Sphingomonas*, F=*Fronidhabitans*, C=*Cryobacterium*, R=*Rhodococcus*, Ps=*Pseudomonas*.

Sustrato/ Producto	Gen	A	S	F	C	R	Ps
Precursor de isoprenoides a GGPP	<i>GGPS</i>	1	1	0	0	0	1
GGPP a entCPP	<i>CPS</i>	0	0	0	0	0	0
entCPP a ent-kaureno	<i>KS</i>	0	0	0	0	0	0
ent-kaureno a ácido ent-kaurenoico	<i>Cyp117</i>	1	1	0	1	1	1
ent-kaurenoico a GA12 aldehído	<i>Cyp114</i>	1	1	1	1	1	1
GA12 aldehído a GA12	<i>SDR GA</i>	0	1	0	0	0	1
GA12 a GA9	<i>Cyp112</i>	1	1	1	1	1	1
GA9 a GA4	<i>Cyp115</i>	1	1	0	1	1	1
GA4 a GA1	<i>P450-3</i>	0	0	0	0	1	0
GA4 a GA7	<i>DES</i>	0	1	0	0	0	1
GA7 a GA3	<i>P450-3</i>	0	0	0	0	1	0

En la Tabla 20 y Figura 18 se muestran los géneros bacterianos capaces de sintetizar giberelinas.

Tabla 20. Géneros bacterianos capaces de completar (sí) o no (no) la biosíntesis de giberelinas. Los nombres de los géneros se resumen así: A=*Arthrobacter*, S=*Sphingomonas*, F=*Fronidhabitans*, C=*Cryobacterium*, R=*Rhodococcus*, Ps=*Pseudomonas*.

Ruta metabólica	A	S	F	C	R	Ps
Biosíntesis de giberelinas	no	no	no	no	no	no

- 1= *Arthrobacter* spp.
- 2= *Cryobacterium* spp.
- 3= *Pseudomonas* spp.
- 4= *Rhodococcus* spp.
- 5= *Sphingomonas* spp.
- 6= *Frontrhizobium* spp.

Biosíntesis de terpenoides

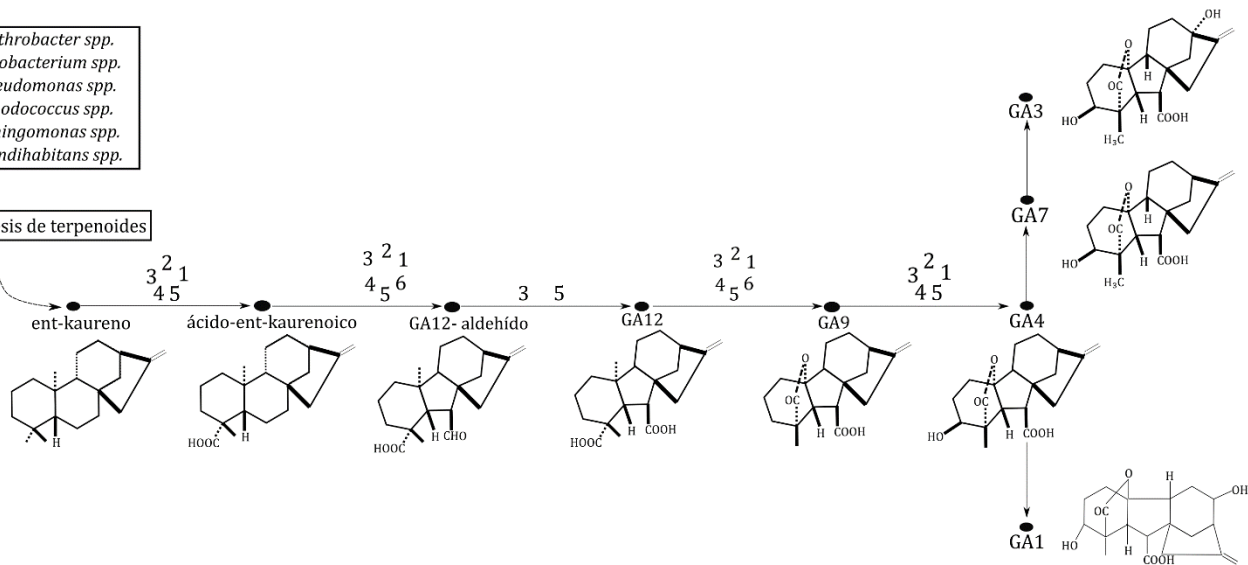


Figura 18. Participación de los géneros estudiados en la síntesis de giberelinas. Los círculos negros indican los sustratos y productos de las subreacciones, las flechas negras indican el sentido de la reacción y los números representan el(los) género(s) que poseen los genes para completar la reacción.

Nitrógeno

Los glaciares en retroceso constituyen uno de los escenarios más notorios donde se puede estudiar la colonización biológica del suelo paralelamente al proceso de formación del suelo. Estas son regiones donde se dan procesos de sucesión primaria, donde las cubiertas de hielo glacial han dado paso a promontorios de los glaciares y liberado sustratos para el desarrollo del suelo (Kandeler et al., 2006).

Dentro de las biocostras de desiertos calientes se ha documentado la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno, principalmente cianobacterias (Belnap, 2001). Muchas de estas bacterias aumentan el contenido de nitrógeno en los suelos y alivian la escasez de nitrógeno que experimentan algunas plantas. Sin embargo, no se encontraron hasta el momento reportes de bacterias heterótrofas presentes en biocostras de desiertos fríos capaces de fijar nitrógeno y hacerlo disponible para las plantas.

Fijación de nitrógeno

De los géneros encontrados en las biocostras del frente glacial del pico Humboldt, sólo *Sphingomonas* y *Pseudomonas* poseen, según las búsquedas metabólicas en las bases de datos, el operón *nifDKH*, el cual es el operón dentro del cual se encuentran los genes *nif* que codifican la enzima nitrogenasa (Tablas 8 y S1). *Sphingomonas* exhibe, además, el gen *anfG*, también involucrado en el proceso de fijación.

Los componentes centrales de la enzima nitrogenasa son proteínas codificadas por los genes *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifE* y *nifN*. Estos genes son universales en los organismos fijadores de

nitrógeno y, en general, tienen historias filogenéticas notablemente congruentes (Raymond et al., 2004). Según Raymond et al. (2004), en casi todos los casos, los genes *nif* se encuentran dentro de uno o varios regulones u operones cotranscritos extensos que no sólo codifican las subunidades de la proteína nitrogenasa funcional, sino que también codifican un conjunto expansivo de proteínas involucradas en la regulación y activación de esta enzima. Adyacentes a los genes *nifH*, *nifD* y *nifK* en la mayoría de los operones *nif* se encuentran los genes *nifE* y *nifN*, típicamente, aunque de forma variable, en el orden *nifHDKEN*. Se cree que *NifE* y *NifN* funcionan como andamios para el ensamblaje del cofactor FeMo o del cofactor FeV y normalmente, si no siempre, están asociados con operones de nitrogenasa dependiente de Mo.

Existen, además, para *Sphingomonas*, genes alternativos de nitrogenasa, como lo es el gen *anfG*, que codifica una enzima nitrogenasa cuyo cofactor de Mo se reemplaza por Fe. Estas denominadas nitrogenasas alternativas se encuentran sólo en un subconjunto limitado de diazótrofos (organismos fijadores de nitrógeno) y, en todos los casos estudiados hasta ahora, están presentes de forma secundaria a la nitrogenasa FeMo. Si hacemos una comparación entre la nitrogenasa convencional, codificada por el gen *nif*, se ha encontrado que la nitrogenasa FeMo es más específica y más eficiente para unir dinitrógeno y reducirlo a amoníaco que cualquiera de las nitrogenasas alternativas (en el orden *nif* > *vnf* > *anf*). Aunque estas nitrogenasas alternativas podrían ser parálogos derivados de la enzima que requiere Mo, estas también podrían representar nitrogenasas primitivas que se han mantenido en varios linajes diversos de procariotas (Raymond et al., 2004).

Aunque existe una gran variedad de especies pertenecientes al género *Sphingomonas*, diversos estudios han identificado hasta el momento sólo a una especie bacteriana del género *Sphingomonas*, *Sphingomonas azotifigens*, como fijadora de nitrógeno (Xie & Yocota, 2006). Aunque otros estudios han sugerido la capacidad de la especie *Sphingomonas paucimobilis* presente en la rizósfera del arroz como diazótrofa, no se conoce si presenta actividad nitrogenasa *in vitro* (Sampaio et al., 2009). En cuanto al género *Pseudomonas*, es la especie *Pseudomonas stutzeri* la única especie registrada con el gen *nifHG*. Según Desnoues et al. (2003), la cepa *A1501* de *Pseudomonas stutzeri* (anteriormente conocida como *Alcaligenes faecalis*) fija nitrógeno en condiciones microaeróbicas en estado de vida libre y coloniza el arroz endófitamente. En esta especie, los genes involucrados en la fijación son contiguos y están presentes en una región de 30 kb en el genoma.

Por lo tanto, tenemos la certeza que algunas de las 12 cepas de biocostras pertenecientes a los géneros bacterianos *Sphingomonas* y *Pseudomonas* estén entre los organismos heterotróficos responsables de otorgar nitrógeno a estos suelos incipientes y pobres de los ecosistemas fríos estudiados, junto a las cianobacterias de vida libre y a los hongos liquenizados por cianobacterias y algas diazótrofes (Llambí et al., 2021). Eso podría probarse analizando la actividad nitrogenasa *in vitro* o al menos, detectando la presencia del gen *nifH* en el ADN genómico o plasmídico de las cepas. Esto último pavimentaría el camino para la detección de nuevas cepas psicrófilas/psicrotolerantes y diazótrofes de utilidad en la agricultura y restauración en regiones frías.

Nitrificación

De las especies bacterianas estudiadas, ninguno de los géneros son capaces de completar la ruta de nitrificación (Tabla 9), puesto que no poseen todos los genes involucrados en dicha vía. Los tres genes implicados en dicha vía son los genes *nxrAB*, *hao* y *amoCAB*. La oxidación de NH_3 a NO^{-2} se lleva a cabo en dos pasos. Primero, el NH_3 se oxida a hidroxilamina (NH_2OH) en una reacción catalizada por la enzima amoníaco monooxigenasa (AMO) unida a la membrana. En segundo lugar, el NH_2OH se oxida posteriormente a NO^{-2} por medio de la enzima periplásmica hidroxilamina oxidorreductasa (HAO; Sayavedra et al., 1998). De estos genes, los géneros *Sphingomonas* y *Rhodococcus* exhiben el gen *amoCAB* y transforman el amonio que llega al suelo a hidroxilamina (Tabla S1). Sin embargo, según los resultados obtenidos, son incapaces de transformar la hidroxilamina a nitrito porque carecen del gen *hao*.

El *BLAST* realizado utilizando *BLAST X* en NCBI, indica que algunas especies de los géneros *Sphingomonas*, *Pseudomonas* y *Rhodococcus* exhiben el gen *hcp*, lo que nos permite postular que puede transformar la hidroxilamina a amonio utilizando la enzima hidroxilamina reductasa. Según Ma et al. (2022), la especie *Rhodococcus erythropolis* posee este gen, es decir, que dicha especie es capaz de tomar la hidroxilamina del medio para producir amonio, lo cual coincide con los resultados obtenidos. Esta ruta puede ser considerada como una ruta de regulación, que permite que el amonio no se acumule en la célula y se transforme en hidroxilamina. Este sustrato se almacena y puede ser transformada de nuevo a amonio cuando las condiciones lo requieran.

Para finalizar esta ruta, el gen *nxrAB* se encarga de codificar la enzima nitrato reductasa. Diferentes especies de los géneros *Arthrobacter*, *Cryobacterium*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* y *Rhodococcus* exhiben dicho gen y tienen la capacidad de transformar el nitrito del medio hasta nitrato.

Aunque los resultados obtenidos parecen indicar que ninguna de estas especies completa dicha ruta (Tabla 9), se ha determinado que la cepa LPN080 del género *Sphingomonas* posee capacidad nitrificante (Yun et al., 2019). Igualmente, en el trabajo de Fitzgerald et al. (2015), se propone que tanto el género *Pseudomonas*, como *Rhodococcus* y *Sphingomonas* están involucradas en la nitrificación en condiciones deficientes de nutrientes.

En cuanto al género *Rhodococcus*, se ha determinado que algunas especies son capaces de llevar a cabo una nitrificación del tipo heterótrofa. Trabajos como el de Whang et al. (2022), indican que una cepa mutante del género *Rhodococcus* sp., CPZ24, presentó una tasa de nitrificación 30,3% mayor que las de las bacterias silvestres. Ellos indican que en este mutante los niveles de expresión del gen *amoAB* aumentaron significativamente con respecto a la cepa silvestre. Así mismo, Chen et al. (2012) encontraron que en biorreactores con inóculos de *Rhodococcus* y bajo condiciones aeróbicas, el 85% del nitrógeno en forma de amónico se transformó en productos de nitrificación. Ellos encontraron que la cepa CPZ24 perteneciente al género *Rhodococcus*, lleva a cabo una nitrificación y desnitrificación simultáneas.

Así mismo, según Castignetti y Hollocher (1984), para el género *Pseudomonas*, la especie *Pseudomonas aureofaciens* puede oxidar *in vitro* la hidroxilamina a nitrito. Aunque no se indica

en este trabajo cómo lo hace, es probable que utilice la enzima codificada por el gen *hao* y que este no esté reportado para *Pseudomonas*. Zhang et al. (2011) indica que la cepa YZN de *P. stutzeri* tiene capacidades de nitrificación heterótrofa. Xie et al. (2021) sugieren que también la cepa *Pseudomonas mendocina* X49 exhibe una capacidad de nitrificación en condiciones aeróbicas heterótrofas. La cepa de *Pseudomonas alcaligenes* aislada del trabajo de Su et al. (2006) también fue considerada una especie nitrificadora por excelencia.

Es probable que todas estas especies utilicen otros genes (como son los genes de la familia *nit6* que codifican nitrito reductasas dependientes de NADPH) y lleven a cabo la nitrificación transformando el amonio hasta nitrito de manera directa sin pasar por hidroxilamina.

Aunque no se han hecho estudios genómicos que confirmen la ausencia de estos genes en los géneros estudiados, Junier et al. (2009) sugiere que la incapacidad de muchas bacterias para llevar a cabo la ruta de nitrificación *in vitro* podría explicarse gracias a que la tasa de nitrificación por parte de las bacterias que oxidan el amoníaco se reduce drásticamente a temperaturas más frías (Ducey et al., 2010).

Los géneros *Arthrobacter*, *Cryobacterium* y *Pseudomonas* exhiben sólo el gen *amoCAB* y según las búsquedas en las bases de datos, carecen de los otros genes involucrados en la ruta. En contraste, el género *Fronidhabitans* no posee ninguno de estos genes (Tablas 8 y S1). No obstante, en cuanto al género *Arthrobacter*, Verstraete y Alexander (1972) determinaron que las células en reposo de *Arthrobacter* sp excretan hasta 60 µg de hidroxilamina por ml cuando se les suministra amonio. Esto indica que es probable que si este género no posee el gen *amoCAB*, debe transformar el amonio a hidroxilamina por otra vía o utilizando otra enzima. Según esos autores, las células en reposo de *Arthrobacter* son capaces de oxidar la hidroxilamina a nitrito, acumulando la hidroxilamina sólo cuando hay disponible una fuente de carbono exógena. Ellos indican que los extractos libres de células contienen una enzima que cataliza la formación de hidroxilamina a partir del ácido acetohidroxámico, una hidroxilamina-nitrito oxidorreductasa y una enzima que produce nitrito y nitrato a partir de varios nitrocompuestos primarios (Verstraete y Alexander, 1972). No obstante, en nuestra búsqueda metabólica el género *Arthrobacter* carece del gen *hao* responsable de esta conversión, por lo que es probable que realice dicho proceso por otra vía o empleando otra enzima. Finalmente, para los géneros *Cryobacterium* y *Fronidhabitans* no se ha encontrado información sobre la capacidad de nitrificación en estos ambientes.

Desnitrificación

Entre los géneros estudiados, se registró que los géneros *Arthrobacter*, *Cryobacterium*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas* y *Rhodococcus* son capaces de completar dicha vía (Tabla 9).

Para el género *Arthrobacter*, se encontró la capacidad de desnitrificación con ayuda de *BLAST X* en la plataforma NCBI y Uniprot, ya que se determinó la presencia de los genes *nirK* y un gen alternativo al gen *nosZ* haciendo un *BLAST* de la secuencia de aminoácidos en la plataforma Uniprot y el gen *norB* en la plataforma NCBI con un *BLAST X* de secuencia de nucleótidos. Es importante mencionar que el gen *nosZ* no fue determinado para el género *Arthrobacter*, sino que se encontró otro gen que codifica a una enzima citocromo oxidasa (código de la enzima: 1.7.99.6) en la especie *Arthrobacter terricola*, la cual es la encargada de llevar a cabo la oxidación del óxido

nitroso hasta nitrógeno molecular. Se trata de una proteína homodimérica multicobre (de aproximadamente 65 kDa), que contiene ocho iones de cobre. Esta proteína fue identificada en el periplasma de *Pseudomonas stutzeri* y su actividad catalítica hacia N_2O fue pronto reconocida. Según Brown et al. (2000), es el dominio C terminal de esta proteína el centro activo al que el N_2O se une, por lo que proponen que esta enzima es una de las que permite la reducción de N_2O a N_2 .

Así, se ha documentado en la literatura, que el género *Arthrobacter* puede llevar a cabo el proceso de nitrificación en condiciones aeróbicas y/o anaeróbicas. Por ejemplo, las cepas HHEP5 y Y10 pertenecientes al género *Arthrobacter* completan la vía de nitrificación heterotrófica (Elkarrach et al., 2021; Zhang et al., 2020; He et al., 2017). De acuerdo con Cua y Stein (2014), también algunas especies del género *Sphingomonas* codifican nitrito y óxido nítrico reductasas. Además, también se ha registrado que algunas especies de *Sphingomonas* codifican los genes *nirK* y *norZ*. Para el género *Pseudomonas*, Carlson e Ingraham (1983), indican que *Pseudomonas stutzeri* y *Pseudomonas aeruginosa* son capaces de reducir el nitrato hasta N_2 . Igualmente, la especie *Pseudomonas mandelii* también posee dichos genes involucrados en la ruta (Lakha et al., 2009). Igualmente, para el género *Rhodococcus* también se ha documentado la capacidad de llevar a cabo la vía de desnitrificación. Por ejemplo, el trabajo de Chen et al. (2012) y el trabajo de Wang et al. (2020) indican que la cepa de *Rhodococcus* CPZ24 aislada de aguas residuales porcinas produce N_2 a partir de nitrato. Así mismo, Ma et al. (2022) documentaron que la especie *Rhodococcus erythropolis* también completa dicha vía.

Anammox

Además de las rutas ya mencionadas, existe otra ruta alternativa que sólo es llevada a cabo en condiciones anaeróbicas para devolver el nitrógeno a la atmósfera. Esta ruta, conocida como anammox, no es llevada a cabo por ninguno de los géneros estudiados (Tabla 9). Muchos de ellos sólo exhiben las enzimas encargadas de oxidar el nitrito hasta óxido nítrico, pero carecen de los genes involucrados en la codificación de enzimas involucradas en la producción de hidracina y su posterior oxidación hasta nitrógeno molecular.

Tal como se observa en el ensamblaje de la ruta general del nitrógeno (Figura 14), los géneros *Pseudomonas*, *Rhodococcus* y *Sphingomonas* son los que presentan la mayor cantidad de genes involucrados en el ciclado de nitrógeno en el suelo. Sin embargo, géneros como *Arthrobacter* y *Cryobacterium* utilizan el nitrógeno para diversas funciones, ya que poseen transportadores de nitrato y nitrito, y probablemente son capaces de reducir este último hasta amonio, o incorporar nitrógeno desde sustancias más complejas como nitroalcano, nitrilo y formamida. En el género *Fronidhabitans* no se detectó la presencia de genes involucrados en el ciclaje de nitrógeno. Las bacterias de este género sólo poseen un par de genes que les permite tomar el amonio del medio para la síntesis de aminoácidos esenciales. Este es un resultado relevante, ya que indica que las bacterias que pertenecen a este género utilizan como aceptor final de electrones sustancias alternativas no nitrogenadas (Unden y Bongaerts, 1997; Balk, 2006; Rissanen et al., 2017).

Así, todas estas bacterias contribuyen al ciclado del nitrógeno en el suelo. Algunas de ellas potencialmente fijan nitrógeno molecular (*Pseudomonas* y *Sphingomonas*), otras lo devuelven a

la atmósfera (*Arthrobacter*, *Cryobacterium*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* y *Rhodococcus*), mantienen un equilibrio entre el nitrito, nitrato y el amonio presentes en el suelo (*Arthrobacter*, *Cryobacterium*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*), o simplemente lo utilizan para la síntesis de aminoácidos esenciales (*Fronidhabitans*; Figura 14).

En conclusión, los géneros bacterianos estudiados tienen un gran potencial como biofertilizantes en suelos desérticos fríos, donde el nitrógeno es un elemento limitante de la energética celular. Aunque no se conocen a nivel de especie las cepas aisladas, es probable que algunas de ellas estén otorgando nitrógeno a estos suelos y contribuyendo a su ciclaje, haciéndolo disponible para las plantas y promoviendo, entre otras cosas, el crecimiento vegetal.

Etileno

En bacterias se ha determinado tanto la capacidad de sintetizar etileno a partir del aminoácido metionina como de regular su producción. De los géneros estudiados, sólo *Fronidhabitans* no exhibe los genes involucrados en dicha síntesis.

En la Tabla 21 se muestra la presencia o ausencia de los genes que codifican las enzimas involucradas en la síntesis y regulación del etileno en los géneros bacterianos aislados.

Tabla 21. Presencia (1) o ausencia (0) de los genes involucrados en la síntesis de etileno en bacterias para cada uno de los géneros estudiados. Se muestran los sustratos utilizados por cada una de las enzimas codificadas por dichos genes y sus productos. Los nombres de los géneros se resumen así: A=*Arthrobacter*, S=*Sphingomonas*, F=*Fronidhabitans*, C=*Cryobacterium*, R=*Rhodococcus*, Ps=*Pseudomonas*.

Sustrato/Producto	Gen	A	S	F	C	R	Ps
L-metionina a S-adenosil-L-metionina	<i>metK</i>	1	1	1	1	1	1
S-adenosil-L-metionina a 1-aminociclopropano-1-carboxilato	<i>ACSI_2_6</i>	1	1	0	1	1	1
1-aminociclopropano-1-carboxilato a etileno	<i>ACO1</i>	1	1	0	1	1	1
1-aminociclopropano-1-carboxilato a 2-oxobutonoato	<i>acdS</i>	1	0	1	1	1	1

La capacidad potencial de síntesis de etileno en los diferentes géneros aislados a partir de biocostras se resume en la Tabla 22 y la Figura 19. En cuanto a la síntesis, sólo el género *Fronidhabitans* no completa la ruta estudiada. Sin embargo, para el proceso de regulación, sólo el género *Sphingomonas* no posee el gen que codifica para la enzima ACC desaminasa.

Tabla 22. Géneros bacterianos capaces de completar (sí) o no (no) la biosíntesis de etileno y su regulación.
 Los nombres de los géneros se resumen así: A=Arthrobacter, S=Sphingomonas, F=Frondihabitans, C=Cryobacterium, R=Rhodococcus, Ps=Pseudomonas.

Ruta metabólica	A	S	F	C	R	Ps
Biosíntesis de etileno	sí	sí	no	sí	sí	sí
Regulación de la producción de etileno	sí	no	sí	sí	sí	sí

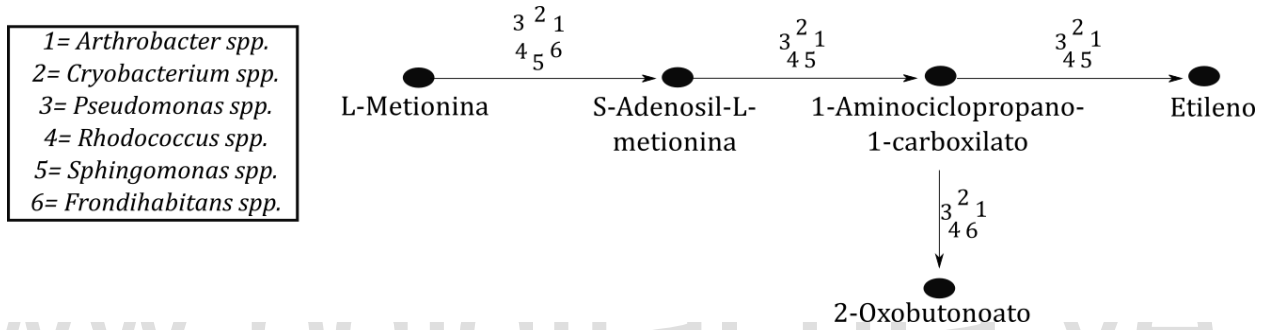


Figura 19. Participación de los géneros estudiados en la síntesis y degradación de etileno. Los círculos negros indican los sustratos y productos de las subreacciones, las flechas negras indican el sentido de la reacción y los números representan el(los) género(s) que poseen los genes para completar la reacción.

Discusión

El derretimiento parcial y en algunos casos total de los glaciares de países ubicados en latitudes tropicales se ha venido registrando en las últimas décadas. Los glaciares andinos han sido severamente afectados, principalmente por el aumento de la temperatura del aire, el efecto invernadero y las actividades humanas. Todos estos factores, combinados con la ocurrencia de años secos y fenómenos como “El Niño”, han disminuido la extensión de los glaciares en la Sierra Nevada de Mérida (Toro et al., 2008). El glaciar ubicado en el pico Humboldt ha estado derriéndose y la pérdida de masa glacial ha sido registrada por diferentes autores (Carrillo & Yépez, 2010; Ramírez et al., 2020).

Cabe destacar que el retroceso notable de este glaciar ha permitido el establecimiento de un nuevo ecosistema en un proceso conocido como sucesión primaria. Llambí y colaboradores en el año 2021, estudiaron el ensamblaje de la vegetación en el frente glacial del Pico Humboldt. Para ello utilizaron un enfoque sincrónico, donde establecieron cuatro transectas de estudio que corresponden a las regiones donde estuvo presente el glaciar desde el año 1910 hasta el año 2009.

En el presente estudio se trabajó con muestras de biocostras obtenidas de la transecta del año 2009. Estas biocostras son el resultado de una asociación íntima entre las partículas del suelo y las cianobacterias, bacterias, algas, microhongos, líquenes y briófitos (en diferentes proporciones) que viven dentro o inmediatamente encima de los milímetros superiores del suelo (Weber et al., 2022). Uno de los tipos de microorganismos más interesantes presentes en las biocostras son las bacterias, ya que a éstas se les atribuyen funciones ecológicas importantes. Las biocostras que se establecen en el glaciar del pico Humboldt seguramente albergan una comunidad diversa de especies y cepas bacterianas, muchas de las cuales han de poseer atributos que les permiten mantenerse activas a bajas temperaturas y proliferar en condiciones de escasez de agua y nutrientes.

Aislamiento de las cepas bacterianas

En este estudio se aislaron 39 cepas bacterianas a $\sim 5^{\circ}\text{C}$, lo que nos permite afirmar que se trata de bacterias psicrófilas o psicrotolerantes, aunque esta última distinción no pudo hacerse, dado que no se contaba con la posibilidad de probar distintas temperaturas controladas. Es muy importante resaltar, sin embargo, que las cepas aisladas sobrevivieron al congelamiento a -20°C por más de un año, embebidas en la matriz de suelo de las biocostras que se habían colectado. Esta observación las define como cepas altamente resistentes no sólo al frío, sino también al congelamiento.

Durante el aislamiento se evitó purificar cepas que tuvieran morfologías de colonias redundantes. El proceso de aislamiento fue llevado a cabo empleando los medios R2A y LB, medios de cultivos pobre y rico en nutrientes, respectivamente. Es importante aclarar que este proceso de aislamiento estuvo condicionado por la naturaleza de los medios de cultivo utilizados (R2A y LB).

El medio R2A es un medio pobre en nutrientes que, debido a su baja concentración de fuentes de carbono y energía, ha sido empleado, por ejemplo, en el estudio de microorganismos heterótrofos en lagos oligotróficos (Ezpeleta et al., 2012) y en el aislamiento de cepas de origen glacial (Ball et al., 2013). Esto nos indica que el medio R2A pudo ser de gran utilidad para el aislamiento en este caso, ya que su baja concentración de nutrientes permite el aislamiento de cepas bacterianas de ambientes carentes de algunos nutrientes (*c.f.* suelos sucesionales incipientes de regiones frías) y de cepas que pudieran ser inhibidas por concentraciones altas de otros nutrientes, los cuales no se encuentran disponibles en estas regiones (LaTorre, 2007). Sin embargo, la desventaja de emplear este medio, según LaTorre (2007) es que selecciona en su mayoría a géneros bacterianos gram-positivos formadores de endósporas, ya que muchas bacterias en respuesta a la disminución de nutrientes y cambios en el ambiente generan estas estructuras, que son formas de resistencia, lo que les permite predominar en el suelo. De esta manera, este medio pudo haber inhibido el crecimiento de otras cepas bacterianas no formadoras de endosporas o de algunas gram-negativas presentes en las biocostras, principalmente de aquellas que requieren elevadas concentraciones de fuentes de energía y nutrientes esenciales.

Por otra parte, el medio LB (medio Luria-Bertani), a diferencia del medio R2A, es uno de los más usados para el cultivo de géneros bacterianos, como por ejemplo *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, etc., debido a que es rico en nutrientes, por lo que permite el crecimiento de una gran variedad de cepas (Garboza et al., 2011). Aunque este medio puede favorecer el crecimiento de cepas con altas tasas de división, puede influir de manera significativa en el crecimiento de aquellas que tienen tasas de división mucho menores, pues bacterias con altas tasas proliferarán mucho más rápido en este medio e impedirán el crecimiento de especies con tasas de división más lentas.

Identificación de las cepas

La identificación de estas cepas se llevó a cabo secuenciando el gen *ARNr 16S* y con un *BLAST* de dichas secuencias en las plataformas NCBI y RDM.CME. Tras la depuración de las secuencias obtenidas, se determinaron cambios de nucleótidos que no se debían a errores del proceso de secuenciación. Sin embargo, debido a que sólo se obtuvieron secuencias en un sentido, en algunos casos se perdieron secciones importantes hacia el final de las secuencias.

Se identificaron las cepas aisladas hasta el nivel de género (Tabla 3), ya que muchas de ellas presentaron una evidente diferencia genética con respecto a las secuencias de referencia, indicando posiblemente que podría tratarse de nuevas especies. Esta idea es apoyada también por el hallazgo de inconsistencias; por ejemplo, entre las primeras dos primeras entradas del *BLAST*, se encontraron varias especies diferentes para cada una de las cepas (Tabla 3). En algunos casos, la cobertura (valor de E) y el porcentaje de identidad para ellas tienen la misma cifra, lo que nos permite llevar a cabo una identificación a nivel de especie. Dado el origen remoto e inexplorado de las cepas encontradas, y debido a su naturaleza poli-extremófila, es probable que al menos algunas de esas cepas pertenezcan a especies nuevas no identificadas. En otras palabras, su evolución pudo haber estado condicionada por el aislamiento geográfico y temporal (*i.e.* hielo glacial) y por condiciones estresantes como altas presiones hidrostáticas y osmóticas, muy baja

disponibilidad de nutrientes y elevadas dosis de radiaciones cósmicas, solares y terrestres (Rondón et al., 2016). En particular, muchas de ellas podrían ser especies bacterianas que se encontraban confinadas al hielo glacial desde hace miles de años y, como producto del deshielo, se establecen en comunidades nuevas como las biocostras. Así, se propone identificar dichas cepas a nivel de especie empleando genes más específicos, un análisis de secuencia multilocus (MLSA; Glaeser & Kämpfer, 2015) o idealmente, la secuenciación del genoma completo para cada una de ellas, en estudios posteriores.

Algunos polimorfismos nucleotídicos puntuales en la secuencia del gen *ARNr 16S* y diferencias en la morfología de las colonias permiten distinguir más de una cepa en el interior de cada género (Figura 11). Esto hace imprescindible su evaluación con técnicas genéticas y genómicas más exhaustivas, y su caracterización morfológica y bioquímica minuciosas. Por ejemplo, la caracterización de los patrones de bandas derivados de la fragmentación con enzimas de restricción empleando electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) es una técnica que está a nuestro alcance y que podría ser de utilidad para la diferenciación de las distintas cepas encontradas. Todos estos enfoques pueden ser necesarios, igualmente, para distinguir cepas que presentan una secuencia nucleotídica idéntica para el gen *ARNr 16S*, pues es bien conocido que este no es necesariamente un criterio que garantice la identidad específica (e.g. Fox et al., 1992).

A continuación se describen las generalidades de los géneros encontrados y se indican las cepas que pertenecen a cada uno de ellos, incluyendo información sobre las dos primeras especies encontradas en la plataforma NCBI para cada una de las cepas aisladas.

El género *Arthrobacter* pertenece al filo de las Actinobacterias, orden Micrococcales y a la familia Micrococcaceae. Según Busse et al. (2015) este género fue propuesto por primera vez por Fischer en 1985 pero fue descrito por Conn y Dimmick en 1947. Este nombre era un *nomen nudum* (nombre desnudo) porque no se nombró ninguna especie, y posteriormente el nombre había sido abandonado incluso por Fischer. Conn y Dimmick (1947) clasificaron tres especies en el género *Arthrobacter*, la especie tipo del género (*Arthrobacter globifite*), *Arthrobacter helvolum* y *Arthrobacter tumescens*. Según Busse et al. (2015), Skerman et al. (1980) luego renombró a *Arthrobacter globifite* como *Arthrobacter globiforme*, y desde entonces este nombre ha estado en uso.

Las especies pertenecientes al género *Arthrobacter* son características de suelo. Sin embargo, se han recuperado de una gran variedad de entornos, que incluyen suelos, agua de mar, agua dulce, piel humana, aceite, salmuera, hojas de tabaco, aire, aguas residuales, lodo activado, pinturas murales, especímenes clínicos y una estera cianobacteriana. Incluso se han detectado cepas de *Arthrobacter* en sedimentos subsuperficiales terrestres a profundidades entre 170 y 220 m (información recopilada por Busse et al., 2015). El género *Arthrobacter* posee una morfología variable con una tendencia a pasar por un ciclo de vida más o menos definitivo. La morfología más característica de este género es que las bacterias son bastones gram-negativos en edades tempranas del cultivo y formas coccoideas gram-positivas (artrósporas) en etapas más avanzadas del cultivo. Sin embargo, en etapas intermedias pueden ser formas ramificadas o filamentos cortos

sin ramas. Los cuerpos esféricos normalmente son grandes y se han denominado "cistitas" (Busse, 2016).

Para este género, se ha registrado que diferentes especies emplean sales de amonio o nitratos como fuentes únicas de nitrógeno. Esto concuerda con las búsquedas metabólicas de los genes involucrados en la ruta del nitrógeno (Figura 14). Además, este género puede utilizar glucosa y a veces otros azúcares como fuente de carbono y energía, pero normalmente sin producir cantidades suficientes de ácido para tener un efecto apreciable sobre el pH de medios altamente amortiguados (por ejemplo, que contengan peptona; Busse, 2016).

De los 28 aislados bacterianos obtenidos, cinco de ellos pertenecen al género *Arthrobacter* (Tabla 3) según la plataforma NCBI. Sin embargo, en la Tabla 3 se observa que para una misma cepa, la secuencia del gen *ARNr 16S* presenta el mismo porcentaje de identidad para diferentes especies (K1 y K15), por lo tanto, es imposible asignar una taxonomía a nivel de especie y nos restringimos a asignar a estas cepas hasta el género *Arthrobacter*. Además, algunas de las cepas (como K8 y K23) presentaron porcentajes de identidad inferior al 97% (Tabla 3). Según un consenso extensamente aceptado y altamente conservador (Stackebrandt & Goebel, 1994), sólo con porcentajes de identidad superiores al 97% podríamos aceptar la identidad específica de una cepa. Según estos autores, además, dos cepas pertenecerían a dos géneros diferentes si el valor de similitud en la secuencia del gen *ARNr 16S* es menor a 95% (Stackebrandt & Goebel, 1994). Sin embargo, Kim et al. (2014) modificaron ese umbral basándose en una mayor disponibilidad de secuencias en las bases de datos. Estos autores proponen que un 98,65% de similitud del *ARNr 16S* puede ser utilizado como umbral para la diferenciación de dos especies. Basándose en cualquiera de los criterios, los porcentajes de identidad relativamente bajos encontrados para K8 y K23 convierten a estas cepas en candidatas para la búsqueda de nuevas especies dentro del género, o incluso podrían determinar la pertenencia de K8 a otro género cercano. Esta última afirmación es sustentada sobre la postulación de Yarzabal et al. (2014), según la cual dos secuencias del gen *ARNr 16S* que se parezcan en más de un 94,5% podrían hacer la distinción a nivel de género.

Tal como se observa en la caracterización cultural de la Tabla 2, las cepas K1, K4, K8, K15 y K23 difieren en cuanto a su superficie, pues K1 y K23 exhiben una superficie del tipo planoconvexa, mientras que K4, K8 y K15 una del tipo convexa. Igualmente, en cuanto a su pigmentación, K4, K8 y K15 son ligeramente diferentes. Aunque esta característica no nos permite indicar que son especies diferentes, este es otro hecho que apoya la identificación de las cepas sólo hasta el nivel de género.

Otro de los géneros encontrados en las biocostras es el género *Cryobacterium*. Este género pertenece al orden Micrococcales y a la familia Microbacteriaceae. Fue propuesto por Suzuki et al. (1997) y contiene bacterias gram-positivas y aeróbicas (Suzuki et al., 1997). Este género se caracteriza por presentar especies psicrófilas. Por ejemplo, Liu et al. (2018) aislaron una bacteria psicrófila, gram-positiva, en forma de bastón (cepa Hh31T), del glaciar Xinjiang en China. En ese estudio, el análisis filogenético basado en las secuencias del gen *ARNr 16S* mostró que la cepa Hh31 T pertenecía al género *Cryobacterium* y estaba más estrechamente relacionada con cepas de *Cryobacterium levicorallinum*, *Cryobacterium luteum* y *Cryobacterium flavum* (Liu et al., 2018).

Igualmente, Suzuki et al. (1997) identificaron y aislaron del suelo antártico la especie *Cryobacterium psychrophilum* (reportado en Liu et al., 2019).

De los aislados bacterianos obtenidos, tres de ellos pertenecen al género *Cryobacterium* (Tabla 3), según la plataforma NCBI. Para la cepa K3-1 y K14, tal como se observa en la Tabla 3, el *BLAST* indica que la segunda secuencia nucleotídica con mayor cobertura, para cada una de ellas, pertenece al género *Leifsonia*, debido a que este es un grupo hermano del género *Cryobacterium* (Reddy et al., 2010). Siguiendo el criterio de Kim et al. (2014), la cepa K3-1 podría ser una especie diferente a *Cryobacterium breve* (Tabla 3). Entre estas tres cepas bacterianas existe una diferencia cultural en cuanto a su superficie, ya que las colonias de K3-1 tienen una superficie del tipo planoconvexa, mientras que las de K11 y K14 son del tipo convexa (Tabla 2).

Por otra parte, el género *Fron dih abitans* pertenece al orden Micrococcales y a la familia Microbacteriaceae. Este género fue descrito por primera vez con el nombre *Fron dic ola*; sin embargo, este nombre se ilegitimó porque es un homónimo posterior del nombre del género fúngico *Fron dic ola*. Por lo tanto, Greene et al. (2007) propusieron un nuevo nombre de género, *Fron dih abitans gen. nov.*, para este taxón. Como resultado, se asume un nuevo nombre para la especie tipo, *Fron dih abitans australicus sp. nov.*, para reemplazar la combinación ilegítima *Fron dic ola australicus* (Zhang et al. 2007). Este género se caracteriza por presentar células de forma de bastoncillos a irregulares (a menudo formando grupos densos de células cuando se cultivan en medio líquido). Son bacterias del tipo gram-positivo, oxidasa-negativo, catalasa-positivo y no mótil. Aunque algunas bacterias de este género han sido aisladas de líquenes en bosques de abetos (Cardinale et al., 2011), en rizósferas de zonas calientes (Lee, 2010) y suelo (Kim et al., 2014), también se han registrado especies psicrófilas simbióticas en líquenes antárticos. Igualmente, según Ramanovskaia et al. (1993), las cepas de *Fron dih abitans* se encuentran con mayor frecuencia entre las bacterias aeróbicas quimioorganotróficas en las fitocenosis antárticas.

De los aislados bacterianos obtenidos, cuatro de ellos pertenecen al género *Fron dih abitans* (K10, K19, K20, K21) y a dos especies diferentes (*Fron dih abitans sucicola* y *Fron dih abitans australicus*; Tabla 3). Sin embargo, según el criterio de Kim et al. (2014), estas cuatro cepas podrían pertenecer a especies diferentes de las encontradas con mayor similitud nucleotídica en las bases de datos. Las diferencias culturales, como se indica en la Tabla 2, son muy sutiles entre las cepas aisladas. Sólo se muestra una diferencia en la pigmentación de las colonias, siendo K10 ligeramente más naranja que las otras tres cepas.

Así mismo, dentro de las biocostras registramos el género *Paenarthrobacter*. En particular, de los aislados obtenidos, uno de ellos pertenece al género *Paenarthrobacter* (Tabla 3). El género *Paenarthrobacter* es un nuevo género propuesto por Busse (2016). En ese estudio, algunas especies del género *Arthrobacter* fueron reclasificadas en cinco grupos dentro de los nuevos géneros *Paenarthrobacter* (el grupo *A. aurescens*), *Pseudarthrobacter gen. nov.* (el grupo *A. oxydans*), *Glutamicibacter gen. nov.* (el grupo *A. protophormiae*), *Paeniglutamicibacter gen. nov.* (el grupo *A. sulfureus*) y *Pseudoglutamicibacter gen. nov.* (el grupo *A. albus/cumminsii*). Las especies *A. aurescens*, *A. histidinolorans*, *A. ilicis*, *A. nicotinovorans*, *A. nitroguajacolicus* y *A.*

ureafaciens se reclasifican en el género *Paenarthrobacter* gen. nov. (Busse, 2016). Al igual que *Arthrobacter*, el género *Paenarthrobacter* pertenece al orden Micrococcales y familia Micrococcaceae. Las células bacterianas que pertenecen a este género tienen forma de bastón con ramas transitorias de 2,50 a 4,00 μm de longitud y la mayoría forman una disposición en forma de V (Cao et al., 2019).

Por otra parte, la mayoría de las cepas aisladas pertenecen al género *Pseudomonas*. El género *Pseudomonas* es uno de los grupos bacterianos más cosmopolita de la naturaleza, y forma parte del orden Pseudomonales y la familia Pseudomonadaceae. En la naturaleza se han registrado algunas especies psicrofílicas, como *Pseudomonas syringae*, que está involucrada en la activación de núcleos de hielo (López et al., 2005), o tres cepas de *Pseudomonas* psicrofílicas para las cuales se evaluó la capacidad de promover el crecimiento en tomate (Orobio & Rozo, 2019). De igual forma, se han identificado especies de *Pseudomonas* de regiones desérticas calientes.

Las *Pseudomonas* son bacterias gram-negativas no formadoras de esporas con forma de bacilo y con uno o más flagelos polares. El género *Pseudomonas* está constituido por especies y cepas metabólicamente versátiles, capaces de utilizar una amplia gama de compuestos orgánicos simples y complejos como fuentes de carbono y energía, que les permiten la colonización de múltiples ambientes naturales y extremos. Aunque muchas de ellas son catalogadas como patógenos humanos, otra parte importante cumple ciclos biológicos de vital importancia para las plantas y los animales (Magallanes, 2014).

De los aislados obtenidos, siete de ellos pertenecen al género *Pseudomonas* (K7-2, K30, K32, K33, K34, K36 y K37; Tabla 3), para las cuales se registraron siete especies diferentes en las dos primeras entradas del BLAST: *P. canavanivorans*, *P. bijjeensis*, *P. fluorescens*, *P. asturiensis*, *P. canadensis*, *P. allivorans* y *P. yamanorum*. Entre las cepas aisladas, K34 y K35 son muy similares culturalmente (Tabla 2). Por su parte, K30, K3 y K33 muestran diferentes bordes y opacidad, mientras que K7-2, K31 y K36 poseen diferente consistencia.

Otro género importante registrado en estas biocostras fue el género *Rhodococcus*. Este género fue descrito por primera vez por Zopf en el año 1891 (Bell et al., 1998). Sin embargo, el nombre no fue utilizado sino hasta mucho tiempo después por Goodfellow (1989). Actualmente, este género pertenece al orden de los Actinomycetales y a la familia Corynebacteriaceae (Bell et al., 1998). El género *Rhodococcus* contempla actinomicetos nocardioformes aerobios, gram-positivos, inmóviles, que contienen micolatos (Goodfellow, 1989). Aunque hay algunas especies patógenas, la mayoría de ellas han sido aisladas de diversos ambientes, incluyendo el suelo y el agua dulce. Distintos estudios han determinado que diferentes especies de *Rhodococcus* están implicadas en procesos de biorremediación para la limpieza de sitios contaminados. Los grandes genomas de los rodococos, sus vías catabólicas redundantes y versátiles, su capacidad para absorber y metabolizar compuestos hidrófobos, formar biopelículas, persistir en condiciones adversas y la disponibilidad de herramientas recientemente desarrolladas para la ingeniería genética, los convierten en microorganismos industriales adecuados para las biotransformaciones y la biodegradación de muchos compuestos orgánicos (Martínková et al., 2009).

De los aislados obtenidos, uno de ellos pertenece al género *Rhodococcus*, la cepa K16. La secuencia nucleotídica del gen *ARNr 16S* para esta cepa presentó un 100% de identidad, en los dos primeros lugares, para la especie *Rhodococcus qingshengii* (Tabla 3).

Finalmente, el género *Sphingomonas* también fue registrado en estas biocostras. Este género fue descrito por primera vez por Yabuuchi et al. (1990; reportado en Balkwill et al., 2003) y pertenece al orden de las Sphingomonadales y a la familia de las Sphingomonadaceae. Aunque contiene algunas especies patógenas, muchas otras especies han sido aisladas de rizósfera, suelo y mar. El género *Sphingomonas* está conformado principalmente por bacterias gram-negativas, en forma de bastón, quimioheterótrofas, estrictamente aeróbicas, que poseen ubiquinona 10 como la principal quinona respiratoria, contienen glicoesfingolípidos (GSL) en lugar de lipopolisacáridos en sus envolturas celulares y, por lo general, producen colonias de pigmento amarillo (Balkwill et al., 2003). Avances recientes han demostrado que estos organismos tienen habilidades únicas para degradar contaminantes refractarios, para servir como antagonistas bacterianos de hongos fitopatógenos y para secretar exopolisacáridos altamente útiles. Desafortunadamente, las *Sphingomonas* también son patógenos animales y también pueden degradar fácilmente las tuberías de cobre en los sistemas de distribución de agua potable (White et al., 1996).

De los 28 aislados bacterianos obtenidos, cinco de ellos pertenecen al género *Sphingomonas* (K2, K3-2, K18, K24 y K25; Tabla 3) y poseen la mayor similitud nucleotídica con seis especies diferentes (*S. glacialis*, *S. qilianensis*, *S. faeni*, *S. aurantiaca*, *S. aerolata* y *S. psychrolutea*). Con respecto a la caracterización cultural de las cepas aisladas (Tabla 2), todas ellas son de color naranja amarillento. K24 presenta, a diferencia de las otras cepas con superficie brillante, una superficie mate. K2 y K18, por su parte, tienen una opacidad translúcida.

Para todas las cepas aisladas e identificadas, no se encontraron estudios que las relacionen con biocostras de desiertos fríos, pues los trabajos que se tienen de biocostras de regiones frías se basan principalmente en los organismos autótrofos presentes en las biocostras, como son las cianobacterias. Sin embargo, algunos trabajos sugieren el mejoramiento de estas comunidades con bacterias heterotróficas de los géneros *Arthrobacter* y *Rhodococcus* en escenarios de sucesión secundaria (Muñoz et al., 2021). En estudios recientes en zonas áridas, se han usado bacterias pertenecientes a los géneros *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Planococcus*, *Rhodococcus* y *Streptomyces* para fijar CO₂ atmosférico a través de su conversión a precipitados de carbonato de calcio. Estos organismos realizan funciones biológicas y ecológicas cruciales para las zonas secas, como la fijación de nitrógeno, y la agregación de las partículas del suelo por liberación de exopolisacáridos (Muñoz et al., 2021).

Sin embargo, no se encontraron estudios previos donde se reporten bacterias psicrófilas y heterótrofas presentes en las comunidades de las biocostras. Por lo tanto, el aislamiento y la identificación de cepas pertenecientes a estos géneros bacterianos son innovadores y resultan de suma importancia, debido a que se ha registrado que muchos de estos géneros exhiben funciones ecológicas importantes, como su capacidad de promover el crecimiento vegetal. Adicionalmente, su carácter de psicofilia y psicrotolerancia pueden estar contribuyendo al establecimiento y correcto desarrollo de especies de plantas nativas en ecosistemas incipientes en ambientes fríos.

Identificación *in silico* de genes funcionales

Fósforo

Las bacterias son los principales microorganismos que otorgan fósforo a los suelos, pues tienen la capacidad de solubilizar el fósforo orgánico y mineralizar el fósforo inorgánico y hacerlo disponible para las plantas. Por tanto, el registro de actividad MSF o MMF en bacterias puede ser de gran utilidad para estos suelos incipientes de páramo, ya que pueden favorecer el establecimiento de plantas pioneras en sucesiones primarias.

Solubilización de fósforo

La síntesis de ácidos orgánicos en el periplasma de diferentes especies bacterianas permite una reducción significativa del pH del medio y la posterior liberación de P. Uno de los ácidos más estudiados para el proceso de solubilización de fósforo es el ácido glucónico. El ácido glucónico es sintetizado, principalmente, por la vía de la oxidación directa de la glucosa. Esta ruta, también conocida como vía de las Pentosas fosfato, es uno de los principales mecanismos empleados por bacterias para la utilización de las aldosas producidas en la glucólisis. Según Paredes & Espinoza, (2010) la primera oxidación se cataliza por la quinoproteína glucosa deshidrogenasa (GDH), así llamada porque pertenece al grupo de enzimas bacterianas que utilizan el cofactor quinónico PQQ (2,7,9-tricarboxil-1H-pirrolo[2,3-f]quinolina-4,5-diona). La PQQGDH transfiere dos electrones directamente de las aldosas a la ubiquinona en la membrana plasmática, ocurren dos oxidaciones que generan protones y que están mediadas por el cofactor PQQ. La oxidación directa de glucosa al ácido glucónico genera un protón transmembranal que puede usarse para la bioenergética y funciones de transporte de la membrana, mientras el protón del ácido glucónico queda disponible para la solubilización de fosfatos. Las bacterias que producen ácido 2-cetoglucónico, normalmente llevan a cabo la segunda oxidación del ácido glucónico periplásmico a 2-cetoglucónico.

En este estudio se determinó que los géneros *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus* y *Sphingomonas* son capaces de completar la solubilización del fósforo, ya que poseen los genes implicados en dicha ruta. Tanto para *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, como para *Sphingomonas* se determinó la presencia del mismo conjunto de genes involucrado en la síntesis de ácido glucónico (Figura 12). En los cuatro géneros se detectó la presencia del gen *gcd* (1.1.5.2) que codifica la quinoproteína glucosa deshidrogenasa que permite tomar la D-glucosa y producir D-glucono-1,5-lactona. Posteriormente, para estos géneros se detectó la presencia del gen 3.1.1.17 que codifica la enzima gluconolactonasa, la cual se encarga de tomar la D-glucono-1,5-lactona para sintetizar D-gluconato (ácido glucónico). Los genes K06151 y el gen *ghrB* (EC.1.1.1.215), que codifican la cadena alfa de gluconato 2-deshidrogenasa y una glioxilato/hidroxipiruvato/2-cetogluconato reductasa, respectivamente, también están presentes en el genoma del género *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas* y *Arthrobacter* permitiendo a bacterias de estos géneros tomar el D-gluconato para producir 2-dehidro-D-gluconato. Además, *Pseudomonas* y *Sphingomonas* también poseen el gen *gdh* que codifica para la enzima glucosa 1-deshidrogenasa (EC. 1.1.1.47), que permite a bacterias de estos géneros tomar la B-D-glucosa para sintetizar D-glucono-1,5-lactona (en una vía alternativa que parte de B-D-glucosa).

Nuestros hallazgos coinciden con el trabajo de Balcázar et al. (2015), donde se muestra *in vitro* la capacidad solubilizadora de P de nueve cepas de *Pseudomonas* aisladas del hielo glacial del Pico Humboldt y del extinto glaciar del Pico Bolívar. En el estudio de Alori et al. (2017) también se reportó la actividad solubilizadora del género *Pseudomonas*, determinándose que el género mejora significativamente el crecimiento de plántulas de maíz, ya que actúa como un biofertilizante al hacer el P disponible. Además, Werra et al. (2009) encontraron que la solubilización del fósforo en una cepa de *Pseudomonas fluorescens* depende en gran medida de su capacidad para producir ácido glucónico. Así mismo, en el estudio de Postma et al. (2010) se ratificó la capacidad solubilizadora de fósforo por parte del género *Pseudomonas*, pues se determinó que las concentraciones más altas de P las disolvieron *Pseudomonas chlororaphis* y *Bacillus pumilus*. Trabajos como los de Balcázar et al. (2015), Postma et al. (2010); Alori et al. (2017); Kour et al. (2020); Hiba et al. (2017); Weimin et al. (2016); Browne et al. (2009) y Restrepo et al. (2014) confirman la capacidad solubilizadora de género *Pseudomonas*.

La capacidad solubilizadora del género *Sphingomonas* está menos documentado. Sin embargo, Asaf et al. (2018) indican que la cepa LK11 del género codifica genes para la solubilización de fosfato que son beneficiosos para promover el crecimiento de las plantas. También Lombardino et al. (2022) indican la presencia de estos genes involucrados en las vías asociadas con la absorción, el metabolismo y la solubilización del fosfato en el suelo. *Sphingomonas sanguinis* y *S. paucimobilis* son las principales especies registradas con esta capacidad.

Así mismo, para los géneros *Rhodococcus* y *Arthrobacter* se ha registrado actividad solubilizadora (Beltrán & Eleonora, 2014). En el 2006 se aislaron bacterias solubilizadoras de suelos subtropicales, donde se detectó que las especies *Arthrobacter ureafaciens* y *Rhodococcus erythropolis* tienen la habilidad para solubilizar fosfato tricálcico. (Chen et al., 2006). Según lo encontrado con *BLAST X*, *Arthrobacter sunyamini* y *Rhodococcus trifolii* son capaces de tomar la D-glucosa proveniente de la glucólisis y metabolizarla hasta D-glucono-1,5-lactona mediante la enzima deshidrogenasa dependiente de PQQ, lo que les permite iniciar y completar la solubilización de fósforo.

Aunque estos géneros posiblemente pueden estar otorgando fósforo a estos suelos por medio del proceso de solubilización, diversos estudios indican que factores como la temperatura, la riqueza nutricional del suelo y el estado fisiológico de la planta pueden afectar la disponibilidad de fósforo en el suelo por esta vía. Según Alori et al. (2017) el proceso de solubilización es óptimo a temperaturas que oscilan entre los 25 y 30°. No obstante, se ha registrado solubilización de fósforo a temperaturas menores de 10°C. Así mismo, se ha registrado que las tasas de solubilización por parte de bacterias del suelo son mayores en climas cálidos y húmedos y mucho menores en climas fríos y secos. Por lo tanto, se sugiere no sólo determinar la presencia de estos genes *in silico* e *in vitro* para los géneros estudiados, sino también hacer pruebas de solubilización a bajas temperaturas (próximas a las temperaturas registradas en el pico Humboldt), como lo hicieron Balcázar et al. (2015).

Mineralización de fósforo

El P orgánico del suelo es una de las principales fuentes de fósforo para las plantas. Este elemento puede ser transformado en P mediante enzimas como fosfatasa, fosfonatasas, fitasas y CP-liasas secretadas por bacterias mineralizadoras de fósforo (Mullen, 2019).

Los genes *PhoD* y *phoN*, que codifican fosfatasa alcalina y ácida, respectivamente, han sido empleados como marcadores moleculares para determinar la capacidad de las bacterias en procesos de mineralización de fósforo (Bergkemper et al., 2016). La presencia de la enzima fosfatasa ácida (EC.3.1.3.2), codificada por el gen *phoN* fue registrada sólo para el género *Pseudomonas* estudiado aquí (Figura 13). Esta enzima se encuentra involucrada en el metabolismo de la rivotravina y en el sistema de dos componentes. Kondo et al. (1991) determinaron la actividad fosfatasa ácida en la especie *Pseudomonas pseudomallei*, lo que confirma los resultados obtenidos.

A diferencia de la fosfatasa ácida, la fosfatasa alcalina (EC.3.1.3.1), codificada por el gen *phoD* está presente en casi todos los géneros estudiados, pues sólo *Fronidhabitans* no exhibe dicho gen. Por lo tanto, es probable que dichos géneros se encuentren involucrados en la mineralización del fósforo en las biocostras establecidas en el pico Humboldt. La capacidad de mineralizar el fósforo por acción fosfatasa alcalina ha sido determinada tanto *in vitro* como *in silico* en diversos estudios para los géneros *Arthrobacter* (Ragot et al., 2015), *Cryobacterium* (Qing et al., 2023), *Pseudomonas* (Filloux et al., 1988; Monds et al., 2006; Anba et al., 1990) *Sphingomonas* (Nilgiriwala et al., 2008; Lukesch et al., 2020) y *Rhodococcus* (Camponovo & García, 2006), donde se ha determinado la presencia de genes como *phoA* y *phoK*, que también codifican fosfatasa alcalinas.

Para el género *Pseudomonas*, el gen *phoD* ha sido reportado por Filloux et al. (1988); estos autores determinaron que dicho gen se encuentra formando parte del regulón *Pho*. Esto concuerda con la presencia de los genes *phoB* y *phoR* para el género *Pseudomonas*, los cuales se encargan de regular la transcripción de dicho regulón.

Otra de las enzimas consideradas con actividad mineralizadora de fósforo son las fosfonatasas. Los fosfonatos son compuestos organofosforados que contienen enlaces C-P muy estables. Se cree que estos compuestos, como el ácido 2-aminoetilfosfónico (ciliatina), ácido fosfonoacético o ácido 2-amino-3-fosfonopropiónico (fosfonoalanina) son utilizados por organismos primitivos. Su presencia en las estructuras de la membrana externa puede proteger a las células de la degradación enzimática o conferirles rigidez adicional porque el enlace C-P es resistente a la hidrólisis química, la descomposición térmica y la fotólisis, así como a la acción de las fosfatasa (Quinn et al., 2007).

Según Quinn et al. (2007), en las bacterias, algunos de los genes que codifican enzimas fosfonatasas están confinados a la regulación del regulón *Pho* y, en general, están controlados por un sistema de transducción de señales de dos componentes que componen una proteína sensora de histidina quinasa de membrana interna (*phoR*) y un regulador de respuesta transcripcional citoplasmático (*phoB*). Los genes *phoR* y *phoB* están presentes en *Arthrobacter*, *Cryobacterium*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus* y *Pseudomonas*. Sin embargo, los genes estudiados aquí (*phnX* y *phnJ*) llevan a cabo el catabolismo microbiano de fosfonato no sujeto al control del regulón *Pho*.

De los géneros estudiados, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* y *Sphingomonas* exhiben el gen *phnX* que codifica la enzima fosfonoacetaldehído hidrolasa (EC.3.11.1.1). Por lo tanto, es probable que estos géneros estén mineralizando fósforo a través de esta enzima en el suelo. Para *Pseudomonas*, Dumora et al. (1997) registraron la presencia de esta enzima en la especie *Pseudomonas aeruginosa* codificada por el gen *phnX*. Igualmente, para *Arthrobacter*, Kononova et al. (2002) indican que además de la degradación de dos AEP, la enzima fosfonatasa también puede participar en la descomposición del glifosato como se demostró en *Arthrobacter atrocyanus*. En el caso de *Sphingomonas* no se encontró bibliografía que confirme la capacidad fosfonatasa de este género.

Así mismo, la enzima CP-liasa (Alfa-D-ribosa-1-metilfosfonato-5-fosfato CP liasa; EC. 4.7.1.1) codificada por el gen *phnJ* es una de las mayormente expresadas en bacterias. Esta enzima está involucrada en el metabolismo del fosfonato y fosfinato, donde se encarga de cortar los enlaces carbono-fósforo de moléculas como alfa-D-ribosa-1-metilfosfonato-5-fosfato. Todos nuestros géneros estudiados poseen dicho gen. Ya esto ha sido registrado por un gran número de autores para el género *Pseudomonas* (Selvapandiyan & Bhatnagar, 1997; Selvapandiyan & Bhatnagar, 1994; Hickey et al., 2012) y *Arthrobacter* (Kertesz et al., 1991).

Aunque todas estas enzimas permiten la mineralización del fósforo, el fósforo presente en el suelo es comúnmente (más del 80%) encontrado como conglomerados insolubles a base de ácido fítico. El ácido fítico es un derivado químico específico del inositol que contiene seis moléculas de fósforo unidas a grupos hidroxilos. Estos residuos de ácido fosfórico son químicamente activos y permiten la unión de los metales (calcio, sodio, potasio, zinc, cobre, entre otros; Mukhametzyanova et al., 2011). Su hidrólisis en la naturaleza se lleva a cabo mediante fitasas microbianas. Estas fitasas se basan en la hidrólisis enzimática de enlaces entre residuos de inositol y ácido fosfórico (Mukhametzyanova et al., 2011).

En este caso se estudió el gen *appA* que codifica la enzima 4-fitasa (EC. 3.1.3.26). Esta enzima, también conocida como fitasa es una hidrolasa que actúa sobre los enlaces éster del fitato. En este estudio, solo el género *Pseudomonas*, exhibe dicho gen y, por tanto, es capaz de expresar la enzima fitasa. Esto concuerda con lo mencionado por Mukhametzyanova et al., (2011), donde se registra al género *Pseudomonas* como productor de fitasa (Hosseinkhani & Hosseinkhani, 2009). Konietzny & Greiner (2004) también registran la capacidad fitasa de este género.

No sólo la expresión de enzimas capaces de mineralizar y solubilizar el fósforo insoluble son importantes para las bacterias y las plantas; también la presencia de transportadores de fosfato es necesaria para incorporar este elemento a biomoléculas esenciales. Los genes *pitA* y *pstS* son algunos de los que codifican transportadores para fósforo. El gen *pstS* forma parte, también, del regulón *Pho*. Entre los géneros estudiados, todos excepto *Fronidhabitans* exhiben dicho gen. En cuanto al transportador codificado por el gen *pitA*, sólo *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas* y *Pseudomonas* exhiben dicho gen.

Los procesos de Solubilización y Mineralización de fósforo, que potencialmente son llevados a cabo dentro de las biocostras del pico Humboldt, pueden estar permitiendo la disponibilidad del fósforo en estos suelos incipientes. Todo este consorcio de interacciones

llevadas a cabo entre los diferentes géneros que componen la biocostra, potencialmente promueven el crecimiento vegetal de plantas al hacer el fósforo disponible para ellas. Así, los géneros *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Cryobacterium*, *Rhodococcus* y *Sphingomonas* pueden estar representados en estas comunidades por especies pioneras que otorgan y hacen disponible el fósforo dentro de la biocostra y de manera general, en este ecosistema incipiente.

Sideróforos

El hierro es un oligoelemento esencial para todos los organismos vivos. Aunque el hierro es abundante en la Tierra, su biodisponibilidad es generalmente baja, ya que se encuentra en estado férrico oxidado (Fe^{3+}), que es en gran medida insoluble a niveles de pH neutros y básicos (Kramer et al., 2020).

Los sideróforos son moléculas quelantes de hierro de bajo peso y alta afinidad sintetizadas por microorganismos (como bacterias) en respuesta a la deficiencia de hierro (Khasheii et al., 2021), por lo que una forma común en que las bacterias adquieren este nutriente es mediante la secreción de dichas moléculas. Los sideróforos son considerados metabolitos secundarios que eliminan el hierro de las reservas ambientales y lo entregan a las células a través de receptores específicos (Kramer et al., 2020). Las formas más comunes de sideróforos son los catecolatos (producidos por bacterias) y los hidroximatos (producidos tanto por bacterias como por hongos; Gupta et al., 2019). Este grupo de moléculas pueden ser sintetizadas por dos vías metabólicas diferentes. A través de péptidos sintasas no ribosomales (NRPS vía estudiada aquí) o por vías independientes de NRPS.

El proceso de síntesis de sideróforos por la vía NRPS es el mejor caracterizado en bacterias. Los NRPS son grandes complejos multidominio y multienzimáticos, en los que cada subunidad es responsable de unir un aminoácido a una cadena peptídica en crecimiento, incluidos aminoácidos e hidroxiácidos no proteinógenos. La arquitectura NRPS estándar comprende secuencias modulares de adenilación (A), condensación (C), proteína portadora de peptidilo (P) y tioesterasa (T), así como otros dominios funcionales específicos que incluyen epimerización (E), oxidación (Ox), metilación (Mt) y ciclación (Cy; Timofeeva et al., 2022). De esta forma, los NRPS están integrados en una molécula precursora que posteriormente es modificada por ya sea NRPS u otras enzimas para formar el sideróforo final. De esta manera, la secreción de sideróforos es un proceso impulsado que requiere gran demanda energética (Kramer et al., 2020).

En este estudio se determinó, en la vía NRPS, la potencialidad de la síntesis de los sideróforos pioquelina, micobactina, vibriobactina, enterobactina, bacilobactina y mixobactina para todos los géneros estudiados (Tabla 10 y Figura 15). *Arthrobacter*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus* y *Pseudomonas* poseen todos los genes involucrados para su síntesis y posterior ensamblaje. Sin embargo, el sideróforo yersiniabactina es sintetizado por *Sphingomonas*, *Rhodococcus* y *Pseudomonas*, mientras que la pioquelina no es sintetizada por ninguno de los géneros estudiados aquí.

Estos resultados concuerdan con Timofeeva et al. (2022), quienes indican que *Pseudomonas* y *Rhodococcus* tienen la capacidad de sintetizar sideróforos. Igualmente, Challaraj

et al. (2012) indican que la especie *Arthrobacter luteolus* es capaz de sintetizar catecolato *in vitro* y la cepa *Arthrobacter JG-9* de sintetizar hidroximato (Bossier & Verstraete., 1986). El trabajo de Kuzyk et al. (2021) indica que especies de *Sphingomonas* tienen capacidad de síntesis de más de un sideróforo. Entre ellas se encuentra la cepa *DCY91* de *Sphingomonas mucosissima*, la cual sintetiza sideróforos *in vitro* (Sukweenadhi et al., 2015).

Aunque se determinó la capacidad de síntesis, en este trabajo no se estudiaron los genes involucrados en la síntesis de receptores de sideróforos presentes en la membrana de estas bacterias. Se sabe que en bacterias gram-negativas (en este caso los géneros *Sphingomonas* y *Pseudomonas*) un mecanismo común involucra el reconocimiento específico del sideróforo cargado de hierro por un receptor de membrana externa en forma de barril β , el cual después de unir el ligando, sufre un cambio conformacional, translocando el sideróforo cargado de hierro al periplasma. Este proceso está respaldado por un complejo *TonB*, que entrega la energía a través de la fuerza motriz del protón, mientras que el transporte del sideróforo cargado de hierro al citosol, donde se produce la reducción del hierro, suele estar mediado por un transportador de casete de membrana que une ATP (Kramer et al., 2020). Los genes involucrados en la síntesis de este complejo pueden ser estudiados, para los géneros bacterianos, en trabajos posteriores.

Según Kramer et al. (2020), en bacterias gram-positivas (como los géneros *Arthrobacter*, *Cryobacterium*, *Fronidhabitans* y *Rhodococcus*) no se requieren receptores de membrana externa, ya que los sideróforos son importados directamente por transportadores de casetes de unión a ATP que atraviesan la membrana celular. No se comprende bien el destino de los sideróforos después de la liberación de hierro.

Los mecanismos de síntesis y absorción de sideróforos se encuentran bajo regulación. El regulador clave más común es *Fur* (regulador de captación férrica), el cual funciona como un represor transcripcional de la síntesis de sideróforos. Cuando se reponen las reservas de hierro intracelular, *Fur* se une al hierro ferroso en el citosol, y este complejo luego se une al promotor de los genes de síntesis de sideróforos. En casos de bajas concentraciones de hierro en la célula se libera la represión por parte de *Fur* y se induce la síntesis de sideróforos (Kramer et al., 2020).

Aunque se sabe que los sideróforos bacterianos proporcionan Fe a las plantas y promueven su crecimiento cuando la biodisponibilidad de Fe es baja, no se han establecido los mecanismos exactos de estos procesos, pero se han propuesto dos posibles formas para que las plantas obtengan Fe a partir de sideróforos microbianos. El primer mecanismo sugiere que los sideróforos bacterianos con un alto potencial redox pueden reducirse para devolver Fe(II) al sistema de transporte de la planta. Se propone que, de acuerdo con este mecanismo, los sideróforos de Fe (III) de las bacterias se transportan primero al apoplasto de la raíz de la planta, donde se produce la reducción de los sideróforos. Por lo tanto, el Fe (II) es capturado por el apoplasto, lo que posiblemente lleve a una alta concentración local de Fe en la raíz. El segundo mecanismo es que los sideróforos bacterianos quelatan el Fe del suelo y realicen un intercambio de ligandos con fitosideróforos. Los mecanismos descritos son teóricos y aún no han sido confirmados experimentalmente (Timofeeva et al., 2022).

En una comunidad microbiana, como son las biocostras, la síntesis de sideróforos por parte de estas bacterias puede tener tanto efectos perjudiciales como benéficos para los otros organismos presentes en ellas. Por ejemplo, los sideróforos podrían hacer que el hierro esté disponible no sólo para la bacteria productora, sino también para otros individuos con receptores similares en su membrana (comensalismo). No obstante, alternativamente, la unión de hierro a sideróforos puede inducir la falta de hierro para otras bacterias que carecen del receptor correspondiente para la absorción (amensalismo), provocando una deficiencia de este elemento en los otros microorganismos que están presentes en estas comunidades microbianas. Así mismo, la síntesis de estas sustancias puede estar inhibiendo el crecimiento de fitopatógenos al secuestrar el hierro disponible para ellos. Es decir, estos géneros bacterianos estarían actuando como bioprotectores para las plantas presentes en estas biocostras.

Síntesis de fitohormonas

Ruta de síntesis del ácido indol-3-acético

Metabólicamente, se han registrado cinco vías principales para llevar a cabo la síntesis biológica de AIA (Tabla 16). El AIA es sintetizado en las plantas y en bacterias a partir del aminoácido triptófano. Sin embargo, existe una vía alternativa en la cual se sintetiza el grupo indol a partir de corismato (independiente de triptófano), al cual se le une un grupo acetato en el carbono 3 del anillo indólico para producir AIA. Las bacterias toman el triptófano presente en los exudados de las raíces de las plantas y lo metabolizan para producir AIA (Figura 16).

En este estudio se llevó a cabo la búsqueda *in silico* de los genes implicados en cada una de las cinco vías por las que se puede sintetizar AIA, en los géneros bacterianos *Arthrobacter*, *Cryobacterium*, *Fronidhabitans*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* y *Sphingomonas*.

Para la vía del ácido pirúvico, ninguno de los géneros estudiados posee los genes necesarios (Tabla 11); esto probablemente se deba a que, según Vega et al. (2016), la ruta del indol-3-piruvato es considerada como la principal vía de biosíntesis de AIA en las plantas. Aunque Vega et al. (2016) indican que la enzima indol-3-piruvato descarboxilasa codificada por el gen *ipdC* ha sido caracterizada en *Pseudomonas putida* y *P. agglomerans*, no se encontró evidencia de éste en las bases de datos.

La ruta del indol-3-acetamida es una de las vías mejor caracterizada en bacterias. Sin embargo, esta ruta sólo fue encontrada en el género *Pseudomonas* (Tabla 12). Esto concuerda con el trabajo de Vega et al. (2016), quien indica que *Pseudomonas savastanoi* y *Pseudomonas agglomerans* completan dicha ruta. Aunque el gen *amiE* que codifica la enzima amidasa (EC.3.5.1.4) está presente en los géneros *Cryobacterium*, *Fronidhabitans*, *Rhodococcus* y *Sphingomonas*, estos géneros no exhiben más genes involucrados en dicha ruta. Se determinó que ninguno de los géneros bacterianos es capaz de completar la ruta de la indolacetaldoxima (Tabla 13), aunque el género *Pseudomonas* exhibe el gen *CYP79B1_2* que codifica la enzima 1.14.14.156. Los resultados obtenidos coinciden con la bibliografía consultada, ya que esta vía es una de las menos conocidas y caracterizadas en bacterias. En contraste, la ruta es bastante común en plantas de la familia Brassicaceae (Sugawara et al., 2009). En el caso de la síntesis de AIA por la vía del indolacetaldehído, se determinó que ninguno de los géneros bacterianos es capaz de completar

dicha ruta (Tabla 14). Aunque el género *Pseudomonas* exhibe los genes *ipdC* y *ALDH* que codifican las enzimas 4.1.1.74 y 1.2.1.3, no posee los genes involucrados en el paso de triptófano hasta indol-3-piruvato por la enzima triptófano aminotransferasa. Esto es congruente, debido a que estas enzimas no han sido caracterizadas en bacterias, sólo en animales, plantas e incluso hongos. No obstante, todos los géneros estudiados poseen el gen *ALDH* que codifica la enzima 1.2.1.3 (aldehído deshidrogenasa dependiente de NAD^+). Esta enzima es una proteína esencial para el mantenimiento celular, pues está involucrada en rutas metabólicas como glucólisis, gluconeogénesis, degradación de ácidos grasos y degradación de aminoácidos. En cuanto a vía de la triptamina, sólo el género bacteriano *Pseudomonas* es capaz de completar dicha ruta (Tabla 15). En conclusión, de los géneros bacterianos explorados, el género *Pseudomonas* es el único que parece estar involucrado en la síntesis de AIA en estos suelos de regiones frías y por lo tanto, pudiera estar bioestimulando el crecimiento de plantas nativas en estos ambientes. Estos datos concuerdan con Balcázar et al. (2015), quienes encontraron en el hielo glacial del pico Humboldt y del extinto glaciar del pico Bolívar, bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* con capacidad de excretar AIA en condiciones de laboratorio.

Giberelinas

Las giberelinas (GA) son fitohormonas que forman parte de una gran familia de diterpenoides. Se ha determinado que las bacterias poseen la capacidad de sintetizar dichas sustancias, pero no se ha comprendido el rol que cumple la síntesis de giberelinas en bacterias. Sin embargo, sí se ha determinado que estas moléculas (sintetizadas o no por bacterias) funcionan como metabolitos secundarios que desempeñan un papel importante como promotoras del crecimiento vegetal. Hasta hace muy poco no se conocía la vía de síntesis de giberelinas en bacterias. No obstante, Nett et al. (2017) proponen una nueva vía de síntesis independiente en bacterias para la producción de GA que es distinta de la biosíntesis de plantas u hongos. Aunque los intermediarios en la biosíntesis bacteriana de GA son idénticos a los de la vía sin 13-hidroxilación que se encuentra en las plantas, las bacterias utilizan un conjunto distinto de enzimas para catalizar las transformaciones relevantes.

El simbionte de la soya, *Bradyrhizobium japonicum USDA110* (ahora clasificado como *Bradyrhizobium diazoefficiens USDA110*), contiene un grupo de genes codificados por un único operón compuesto por una isoprenoide sintasa (IDS), dos supuestas diterpeno ciclasas (CPS y KS), tres CYP (CYP112, CYP114 y CYP117), una ferredoxina (FdGA) y una deshidrogenasa/reductasa de cadena corta (SDRGA). La presencia de IDS y supuestas diterpeno ciclasas junto con enzimas oxidativas, particularmente CYP, llevó a la especulación de que este operón está involucrado en la biosíntesis de GA. Estas enzimas, conocidas con los nombres CYP112, CYP114 y CYP117, parecen ser claramente de ascendencia bacteriana. Además, las bacterias utilizan otra enzima, conocida como SDRGA para convertir eficientemente de GA12-aldehído a GA12. Este paso es exclusivo de la biosíntesis bacteriana de GA (Nett et al., 2017).

En nuestro estudio, se determinó que ninguno de los géneros estudiados completa dicha ruta. Sin embargo, se verificó la presencia de los genes P450 (*cyp117*, *cyp114*, *cyp112* y *cyp115*) para los géneros *Arthrobacter*, *Cryobacterium*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas* y *Pseudomonas*. El género *Frondehabitans* sólo exhibe los genes *cyp114* y *cyp112*.

Aunque es evidente la presencia de estos genes, que metabolizan productos aguas abajo del ent-kaureno, no se determinó la presencia de los genes *CPS* y *KS* (los cuales sólo han sido caracterizados en *Bradyrhizobium japonicum*, *Sinorhizobium fredii*, *Mesorhizobium loti* y *Rhizobium etli*) en alguno de los géneros estudiados, por lo que (según los resultados mostrados aquí) éstos no pueden completar esta ruta. No obstante, el gen *SDR_{GA}* fue determinado en los géneros *Pseudomonas* y *Sphingomonas*. Así mismo determinamos la presencia del gen GGPS, involucrado en el primer paso de la reacción, en los géneros *Pseudomonas*, *Arthrobacter* y *Sphingomonas*.

De esta manera, aunque parece que *Pseudomonas* y *Sphingomonas* poseen casi todos los genes involucrados en dicha ruta, es evidente la ausencia de los dos primeros genes (*CPS* y *KS*) implicados en dicha vía metabólica, por lo que no parecen ser capaces de completar la síntesis de giberelinas.

Citoquininas

Sólo recientemente se ha demostrado que las citoquininas desempeñan un papel importante en la inmunidad de las plantas. Los niveles elevados de citoquininas como la trans-zeatina inducen resistencia contra patógenos en diferentes especies de plantas (Großkinsky et al., 2013).

La zeatina es una de las citoquininas mejor caracterizada en plantas. Se ha determinado que dicha hormona es sintetizada por bacterias, las cuales pueden producirla mediante al menos dos vías metabólicas diferentes (Figura 17). La síntesis *de novo* implica la isopentenilación directa de AMP catalizada por dimetilaliltransferasa (DMAT), que se caracterizó por primera vez en *Agrobacterium tumefaciens* (Kanehisa et al., 2023). La segunda vía de producción de citoquininas bacterianas, fue la encontrada para todos los géneros estudiados aquí; esta vía implica el recambio de ARNt modificado por la enzima isopentenil tARN transferasa. Esta vía de degradación del ARNt implica la modificación de una adenina, la cual es isopentenilada por la isopentenil tARN transferasa, el producto del gen *miaA* (EC.2.5.1.75). En algunas bacterias, esta adenina modificada se metiltiola y/o hidroxila posteriormente. Basándose en ésto, se ha planteado la hipótesis de que el producto (Prenil-t ARN) es isomerizado (sin acción enzimática) y se libera como citoquinina libre (Kanehisa et al., 2023).

No obstante, en bacterias, la cadena lateral de isopentenilo del residuo de adenina está cis-hidroxilada y, por lo tanto, el ribósido de cis-zeatina y/o la metiltiolzeatina se libera tras la degradación del ARNt. Según Koenig et al. (2002), este isómero es considerado biológicamente inactivo como hormona vegetal, en contraste con las trans-citoquininas sintetizadas *de novo*. Debido a la diferencia en estereoisomería entre las dos vías de biosíntesis de citoquininas, se ha asumido que el recambio de ARNt hace una contribución menor, en el mejor de los casos, al conjunto de citoquininas de la planta.

Sin embargo, estudios recientes indican la gran importancia de la cis-zeatina en el mantenimiento de las plantas (Spíchal, 2012). El estudio de Gajdosová et al. (2011) sugiere que la cis-zeatina se encuentran de manera ubicua en el reino vegetal y que dicha abundancia podría correlacionarse con una estrategia de vida. Este mismo autor indica que este isómero está involucrado en la regulación de las respuestas metabólicas y fisiológicas en plantas en condiciones

limitantes del crecimiento. Otras de las funciones que pueden estar siendo mediadas por cis-zeatina en plantas son el mantenimiento de citoquinina en estado basal, la inducción de esterilidad masculina y la respuesta al estrés salino, sequía, calor, o estrés biótico (Pertry et al., 2009).

Por lo tanto, la capacidad de los géneros *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* y *Sphingomonas* en la síntesis de cis-zeatina resulta de enorme interés, pues podría estar contribuyendo al establecimiento y mantenimiento de las especies de plantas en ambientes poli-extremos, como lo es el frente glacial del pico Humboldt.

Aunque nuestros resultados no muestran la capacidad de sintetizar trans-zeatina en los géneros estudiados, en el trabajo de Akiyoshi et al. (1987) se identificaron cepas del género *Pseudomonas* productoras de trans-zeatina *in vitro*. Específicamente, *Pseudomonas solanacearum* y *Pseudomonas syringae* son capaces de sintetizar trans-zeatina en niveles de hasta 1 mg/litro. Así mismo, Karnwal & Kaushik (2011) indican que en presencia de arroz, la producción de trans-zeatina es mayor para cepas bacterianas del género *Pseudomonas*. De igual forma, la cepa PB213-2 de *Pseudomonas savastanoi* secreta zeatina (80 nanogramos por mililitro; MacDonald et al., 1986). No obstante, estos trabajos no determinan por cuál ruta metabólica dichas cepas producen trans-zeatina ni el gen que codifica la enzima encargada.

Igualmente, para el género *Arthrobacter*, Velazco et al. (2019) indica que este género es capaz de sintetizar dicho compuesto; sin embargo, no explica si se trata de trans o cis-zeatina. Sin embargo, Taller & Wong. (1989) detectaron citoquininas activas en el medio y las identificaron tentativamente como trans-zeatina. Finalmente, Donderski & Głuchowska (2000) indican que *Arthrobacter* tiene la capacidad de sintetizar trans-zeatina.

Etileno

El etileno es una de las hormonas vegetales más importantes para el crecimiento de la planta, ya que está involucrado en el desarrollo en procesos tales como germinación de las semillas, desarrollo de pelos radiculares, nodulación de la raíz, maduración de los frutos, abscisión y senescencia. También es un importante mediador en la respuesta a distintos tipos de estrés, tanto bióticos (por, ejemplo, ataque por patógenos) como abióticos (como daño, hipoxia, frío, sequía; Weingart et al., 1996).

En plantas y algunas veces en bacterias, la síntesis del etileno es llevada a cabo en el metabolismo de la cisteína y metionina, donde es sintetizado a partir de L-metionina utilizando como intermediario de reacción el aminociclopropano-1-carboxilato.

En esta ocasión se estudiaron los genes *metK*, que codifica una S-adenosilmetionina sintasa (EC.2.5.1.6), *ACSI_2_6* que codifica para la 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (EC.4.4.1.14), la enzima aminociclopropanocarboxilato oxidasa (EC. 1.14.17.4) y la 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (EC:3.5.99.7). Se determinó que todos los géneros estudiados, excepto *Fronidihabitans*, completan dicha ruta y poseen, incluso, el gen de la ACC desaminasa necesario para regular altas concentraciones de etileno en la planta. La determinación de la enzima EC.4.4.1.14 (segunda enzima involucrada en la ruta del etileno) codificada por el gen *ACSI_2_6* fue llevada a cabo en los géneros *Arthrobacter*, *Sphingomonas* y *Rhodococcus*

utilizando la plataforma Uniprot; por lo tanto, no se tiene evidencia de la presencia de un gen homólogo al buscado. Sólo para *Pseudomonas* y *Cryobacterium* fue hallado un gen homólogo al estudiado (con el uso de *BLAST X*) arrojando la presencia de una enzima llamada aminotransferasa de clase I/II.

Los géneros *Rhodococcus* (Hazarika & Thakur, 2020) *Pseudomonas* (Sethy et al., 2023; Vardhan et al., 2023) y *Arthrobacter* (Barnawal et al., 2014) están entre los principales géneros bacterianos capaces de llevar a cabo la síntesis de ACC desaminasa y, por lo tanto, de degradar el precursor de etileno (ACC), mejorando así la respuesta de la planta a episodios prolongados de estrés y evitando la muerte celular por acumulación de etileno.

Con base en estos resultados, es evidente el posible rol que cumplen estos géneros bacterianos en cuanto a la regulación de los niveles de etileno en las raíces de las plantas a las cuales se encuentran asociados, ya que pueden estar involucrados tanto en la síntesis de etileno como en su degradación (Tabla 22). Por lo tanto, la actividad de estas bacterias podría estar mediando la respuesta de las plantas a niveles intensos de estrés en la sucesión primaria en el frente del glaciar del Humboldt.

www.bdigital.ula.ve

Conclusiones y perspectivas

Conclusiones

- Las bacterias psicrófilas y psicrotolerantes se encuentran entre los principales organismos procariotas presentes en las biocostras establecidas en el frente glacial del pico Humboldt tras la desaparición del glaciar.
- Los géneros bacterianos *Arthrobacter*, *Cryobacterium*, *Fron dih abitans*, *Phaenarthrobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* y *Rhodococcus* se encuentran entre los más representados entre las bacterias cultivables (en nuestras condiciones de laboratorio) a partir de las biocostras del frente glacial del pico Humboldt. El aislamiento de varias cepas distintas de estos siete géneros bacterianos en sólo dos medios de cultivo y en condiciones restrictivas indican que las biocostras del frente glacial del pico Humboldt son reservorios importantes de microorganismos para los ecosistemas en formación.
- Las cepas aisladas no son sólo altamente resistentes al frío, sino también al congelamiento por períodos prolongados de tiempo.
- Los procesos de solubilización y mineralización de fósforo permiten la biodisponibilidad del fósforo en estos suelos incipientes. La participación de diferentes géneros bacterianos que componen la biocostra en el consorcio de interacciones que ocurren en la interfaz suelo-planta-microorganismo podría promover el establecimiento y crecimiento vegetal de las plantas al hacer el fósforo disponible para ellas. Así, los géneros *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Cryobacterium*, *Rhodococcus* y *Sphingomonas* pueden estar representados en estas comunidades complejas por especies pioneras que otorgan y hacen disponible el fósforo dentro de las biocostras y de manera general, en los suelos de este ecosistema incipiente.
- Todos los géneros bacterianos estudiados aquí parecen estar contribuyendo al ciclado del nitrógeno en este suelo incipiente, de distintas formas. Algunas de ellas potencialmente fijan nitrógeno molecular (*Pseudomonas* y *Sphingomonas*), otras lo devuelven a la atmósfera (*Arthrobacter*, *Cryobacterium*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* y *Rhodococcus*), otras mantienen un equilibrio entre el nitrito, nitrato y el amonio presentes en el suelo (*Arthrobacter*, *Cryobacterium*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*), o simplemente lo utilizan para la síntesis de aminoácidos esenciales (*Fron dih abitans*). Por tanto, los géneros bacterianos estudiados acá tienen un gran potencial como biofertilizantes en suelos desérticos fríos, donde el nitrógeno es un elemento limitante de la energética celular.
- La potencialidad de la síntesis de los sideróforos pioquelina, micobactina, vibriobactina, enterobactina, bacilobactina y mixobactina fue registrada para todos los géneros estudiados. Los géneros *Arthrobacter*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus* y *Pseudomonas* poseen todos los genes involucrados para su síntesis y posterior ensamblaje. Sin embargo, el sideróforo yersiniabactina es sintetizado por *Sphingomonas*, *Rhodococcus* y *Pseudomonas*, mientras que la pioquelina no es sintetizada por ninguno de los géneros estudiados aquí. Todo esto sugiere que las

cepas bacterianas acá estudiadas podrían estar actuando como bioprotectores de las plantas nativas y podrían tener esta aplicación en cultivos de tierras frías.

- De los géneros bacterianos explorados, el género *Pseudomonas* es el único que parece estar involucrado en la síntesis de AIA en estos suelos de regiones frías y, por lo tanto, pudiera estar bioestimulando el crecimiento de plantas nativas en estos ambientes.
- Ninguno de los géneros estudiados completa la vía de síntesis de giberelinas, pero los géneros *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* y *Sphingomonas* parecen tener la potencialidad genética de sintetizar cis-zeatina. La síntesis de cis-zeatina puede ser de gran importancia para las especies de plantas establecidas en regiones poli-extremas como el frente glacial del pico Humboldt, sometidas a condiciones de alto estrés.
- Se determinó que todos los géneros estudiados, excepto *Fronidhabitans*, completan la ruta de síntesis y regulación de etileno.
- Se observó que entre los géneros analizados, el género *Pseudomonas* es el que muestra una mayor versatilidad metabólica relacionada con diversas funciones ecológicas y aplicaciones biotecnológicas relevantes.
- Las bacterias pertenecientes a los géneros *Arthrobacter*, *Cryobacterium*, *Fronidhabitans*, *Phaenarthrobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* y *Rhodococcus* juegan un papel fundamental en las rutas metabólicas estudiadas y podrían estar contribuyendo a la formación del suelo y la colonización vegetal en escenarios de sucesión primaria en regiones desérticas frías.
- Es importante resaltar que en algunos casos existe una inconsistencia entre las construcciones metabólicas obtenidas *in silico* para una ruta y género específicos, y las informaciones recabadas en la literatura sobre el metabolismo real probado experimentalmente para dicho género. Aunque no podemos estar seguros de las causas de estas inconsistencias, podemos suponer que las diversas rutas metabólicas en bacterias aún están bajo investigación, y no aparecen reportadas exhaustivamente en la plataforma KEGG. Por lo tanto, las inconsistencias derivan de vacíos de información a nivel de la caracterización y expresión de los genes funcionales.

Perspectivas

- Evaluar mediante crecimiento a diferentes temperaturas controladas, el carácter de psicofilia o psicrotolerancia de las cepas bacterianas aisladas.
- Completar la identificación molecular de las cepas bacterianas no identificadas, mediante el uso de otros cebadores oligonucleotídicos del gen *ARNr 16S*.
- Estudiar, mediante análisis *in vitro*, la capacidad potencial y real de las cepas bacterianas aisladas para cada una de las rutas metabólicas estudiadas. Para completar el estudio de potencialidades metabólicas, sería imprescindible estudiar la presencia o ausencia de los genes presentes en las cepas aisladas, con ayuda de

la amplificación por PCR de genes funcionales específicos. Para estudiar las capacidades metabólicas reales, se deberían realizar pruebas bioquímicas específicas de cada ruta.

- Secuenciar el genoma completo de una selección de cepas bacterianas aisladas de las biocostras del frente glacial del pico Humboldt, para llevar a cabo la caracterización genética de la fisiología poli-extremófila de estas cepas, de sus funciones ecológicas, genes de resistencia, potencialidades biotecnológicas, etc.
- Con base en la secuenciación del genoma completo de estas cepas bacterianas, llevar a cabo su identificación hasta el nivel de especie y la publicación de sus relaciones evolutivas con cepas conocidas. Alternativamente, hacer la identificación específica y la distinción entre distintas cepas indistinguibles a nivel del gen *ARNr 16S*, mediante el uso de un enfoque multilocus, o a través de la secuenciación de genes utilizados en estudios filogenéticos en el interior de cada género.

www.bdigital.ula.ve

Referencias

- Abyzov, S; Bobin, N & Koudryashov, B (1982) Quantitative assessment of microorganisms in microbiological studies of Antarctic glaciers. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences*. 9:558–564.
- Aguado, G; Moreno, B; Jimenez, B; Garcia, E & Preciado, R (2012) Impact of the microbial siderophores and phytosiderophores on the iron assimilation by plants: a synthesis. *Rev. Fitotec. Mex.* 35: 9 – 21.
- Akiyoshi, D; Regier, D & Gordon, M (1987) Cytokinin production by *Agrobacterium* and *Pseudomonas spp.* *Rev Journal of Bacteriology*. 169: 9-15
- Alori, E; Glick, B & Babalola, O (2017) Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. *Rev Front. Microbiol.* 8:971-979
- Anba, J; Bidaud, M; Vasil, M & Lazdunski, A (1990) Nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* *phoB* gene, the regulatory gene for the phosphate regulon. *Rev Journal of Bacteriology*. 72: 1-8.
- Anesio, AM & Laybourn-Parry, J (2012) Glaciers and ice sheets as a biome, *Trends in Ecology & Evolution*. 27: 219-225.
- Arrillaga, L (2017) Aplicación de técnicas para reducir la compacidad del racimo de la variedad Tannat y análisis de sus efectos sobre el rendimiento, la sanidad y la composición de la baya. Tesis de licenciatura. Universidad de la república. Facultad de agronomía. Uruguay.
- Asaf, S; Khan, A & Khan, M (2018) Complete genome sequencing and analysis of endophytic *Sphingomonas sp. LK11* and its potential in plant growth. *Rev Biotech.* 8: 389-397.
- Avalos, J; Fernandez, R; Prado, M; Giordano, W; Domenech, C & Cerda, E (1999) Biosíntesis de giberelinas, bikaverina y carotenoides en *Gibberella fujikuroi*. *Rev Biotecnología y Aplicaciones de Microorganismos Pigmentados*. 1: 169-189.
- Azcon, J & Talón, M (2013) *Fundamentos de fisiología vegetal*, segunda edición.
- Backer, R; Rokem, S; Ilangumaran, G; Lamont, J; Praslickova, D; Ricci, E; Subramanian, S & Smith, D (2018) Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Front. Plant Sci.* 9: 1473-1490.
- Balcázar, W; Rondón, J; Rengifo, M; Ball, M; Melfo, A; Gómez, W & Yarzabal, L (2015) Bioprospecting glacial ice for plant growth promoting bacteria. *Elsevier Microbiological Research*. 177:1-7.
- Balk, M (2006) Life in the Absence of Oxygen: Alternative Electron Acceptors for Anaerobic Microorganisms in a Petroleum Environment. *Rev Turk J Biol.* 31: 59-66.
- Balkwill, D; Fredrickson, J & Romine, M (2003) *Sphingomonas* and Related Genera. United States: N. p., 2003. Web.
- Ball, M; Gómez, W; Magallanes, X; Rosales, R; Melfo, A & Yarzabal, L (2013) Bacteria recovered from a high altitude, tropical glacier in Venezuelan Andes. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 1: 1-11.
- Barnawal, D; Bharti, N; Maji, D; Chanotiya, C & Kalra, A (2014) ACC deaminase-containing *Arthrobacter protophormiae* induces NaCl stress tolerance through reduced ACC oxidase activity and ethylene production resulting in improved nodulation and mycorrhization in *Pisum sativum*. *Rev J Plant Physiol.* 171: 884-894.

Beccati, A; Gerken, J; Quast, C; Yilmaz, P & Glöckner, F (2017) Visor de árboles SILVA: navegación web interactiva de los árboles guía filogenéticos SILVA. BMC Bioinformática. 18:43.

Bell, K; Philp, J; Aw, D & Christofi, N (1998) The genus *Rhodococcus*. Rev Journal of Applied Microbiology. 85:195–210.

Belnap, J (2001) Influence of Biological Soil Crusts on Soil Environments and Vascular Plants. Rev, Ecological studies. 150: 281-300.

Belnap, J (2003) The world at your feet: desert biological soil crusts. Frontiers in Ecology and the Environment. 1:181-189.

Beltrán, M (2014) Phosphate solubilization as a microbial strategy for promoting plant growth. Rev Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu. 15: 101-113.

Beltrán, P & Eleonora, M (2014) La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. Rev Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 15: 101-113.

Bergkemper, F; Kublik, S; Lang, F; Kruger, J; Vestergaard, G; Schlöler, M & Schulz, S (2016) Novel oligonucleotide primers reveal a high diversity of microbes which drive phosphorous turnover in soil. Journal of Microbiological Methods. 125:91-87.

Bidle, K; Lee, S; Marchant, D & Falkowski, P (2007) Fossil genes and microbes in the oldest ice on earth. Proceedings of the National Academy of Sciences. 104:13455–13460.

Blasco, F; Guigliarelli, B; Magalon, A; Asso, M; Giordano, G & Rothery, R (2001) The coordination and function of the redox centres of the membrane-bound nitrate reductases. Rev Cellular and Molecular Life Sciences CMLS. 58: 179-193.

Bossier, P & Verstraete, W (1986) Ecology of *Arthrobacter* JG-9-detectable hydroxamate siderophores in soils. Rev Soil Biology and Biochemistry. 18: 487-492.

Bowker, M (2007) Biological Soil Crust Rehabilitation in Theory and Practice: An Underexploited Opportunity. Rev Restoration Ecology. 15: 13–23.

Braker, G; Zhou, J; Wu, L; Devol, A & Tiedje, M (2000) Nitrite Reductase Genes (*nirK* and *nirS*) as Functional Markers To Investigate Diversity of Denitrifying Bacteria in Pacific Northwest Marine Sediment Communities. Rev Applied and Environmental Microbiology. 66: 1-10.

Brotherson, J & Rushforth, S (1983) Influence of cryptogamic crusts on moisture relationships of soils in Navajo national monument, Arizona. El Naturalista de la gran Cuenca. 43:73-78.

Brown, K; Tegoni, M; Prudêncio, M; Pereira, A; Besson, S; Moura, J; Moura, I & Cambillau, C (2000) A novel type of catalytic copper cluster in nitrous oxide reductase. Rev Nature Structural Biology. 7: 191-195.

Browne, P; Rice, O; Miller, S; Burke, J; Dowling, D; Morrissey, J & O’Gara, F (2009) Superior inorganic phosphate solubilization is linked to phylogeny within the *Pseudomonas fluorescens* complex. Rev Applied Soil Ecology. 43: 131-138.

Busse, H (2016) Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter sensu lato*, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter gen. nov.*, *Paeniglutamicibacter gen. nov.*, *Pseudoglutamicibacter gen. nov.*, *Paenarthrobacter gen. nov.* and *Pseudarthrobacter gen. nov.*, and emended description of *Arthrobacter roseus*. Rev International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 66: 9-37.

Busse, H; Wieser, M & Buczolits, S (2015) *Arthrobacter*. Rev Bergey’s manual of systematic of archaea and bacteria. 1: 1-71.

Camponovo, C & García, P. (2006). *Rhodococcus equi*. Rev chilena de infectología. 23: 155-156.

Cao, L; Zhang, J; Zhao, R; Deng, Y; Liu, J; Fu, W; Lei, Y; Zhang, T; Li, X & Li, B (2019) Genomic characterization, kinetics, and pathways of sulfamethazine biodegradation by *Paenarthrobacter* sp. Rev Elsevier. 131: 1-10.

Cardinale, M; Grube, M & Berg, G (2011) *Fronidhabitans cladoniophilus* sp. nov., an actinobacterium of the family Microbacteriaceae isolated from lichen, and emended description of the genus *Fronidhabitans*. Rev International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 61: 1-10.

Carlson, C e Ingraham, J (1983) Comparison of denitrification by *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Paracoccus denitrificans*. Rev Applied and Environmental Microbiology. 45: 1-10.

Carrillo, E & Yépez, S (2010) Evolución de glaciares en Venezuela. Glaciares de los picos Humboldt y Bonpland. Research Gate. 1:123-136.

Castignetti, D & Hollocher, T (1984) Heterotrophic nitrification among denitrifiers. Rev Applied and Environmental Microbiology. 47: 620-623.

Castillo, A & Maestre, F (2011) La costra biológica del suelo: Avances recientes en el conocimiento de su estructura y función ecológica. Revista Chilena de Historia Natural. 84:1-21.

Challaraj, E; Ananthi, T; Anandkumar, B & Maruthamuthu, S (2012) Accumulation of rare earth elements by siderophore-forming *Arthrobacter luteolus* isolated from rare earth environment of Chavara, India. Rev J Biosci. 37: 25–31

Chapin, F; Walker, L; Fastie, C & Sharman, L (1994) Mecanismos de sucesión primaria después de la desglaciación en Glacier Bay, Alaska. Monografías Ecológicas. 64:149-175.

Chen, P; Li, J; Li, Q; Wang, Y; Li, S; Ren, T & Wang, L (2012) Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by bacterium *Rhodococcus* sp. CPZ24. Rev Elsevier. 116: 266-270.

Chen, Y; Rekha, A; Arun, F; Shen, W; Lai, C & Young, C (2006) Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Rev Applied Soil Ecology. 34: 33-41.

Christner, B; Mosley, T; Thompson, L; Zagorodnov, V; Sandman, K & Reeve, J (2000) Recovery and identification of viable bacteria immured in glacial ice. Icarus. 144:479-485.

Clements, F (1916) Plant succession: an analysis of the development of vegetation. Carnegie Institution of Washington 1: 1-20.

Coelho, C; González, P; Trincão, J; Carvalho, A; Najmudin, S; Hettman, T; Dieckman, S; Moura, J; Moura, I & Romão, M (2007) Heterodimeric nitrate reductase (NapAB) from *Cupriavidus necator* H16: purification, crystallization and preliminary X-ray analysis. Rev Structural Biology Communications. 63: 516-519.

Crosa, J. & Walsh, C. (2002) Genetics and Assembly Line Enzymology of Siderophore Biosynthesis in Bacteria Microbiology and molecular biology reviews. 66: 223-249.

Cua, L & Stein, L (2014) Characterization of denitrifying activity by the alphaproteobacterium, *Sphingomonas wittichii* RW1. Rev Front. Microbiol. 5: 1-10.

Desnoues, N; Lin, M; Guo, X; Ma, L ; Carreño, R & Elmerich, C (2003) Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. Rev Microbiology. 149: 2251.2262.

Donderski, W & Głuchowska, M (2000) Production of Cytokinin-like Substances by Planktonic Bacteria Isolated from Lake Jeziorak. *Rev Polish Journal of Environmental Studies*. 9: 369-376.

Ducey, T; Vanotti, M; Shriner, A; Szogi, A & Ellison, Q (2010) Characterization of a microbial community capable of nitrification at cold temperature. *Rev Elsevier*. 101: 491-500.

Dumora, C; Marche, M; Doignon, F; Aigle, M; Cassaigne, A & Crouzet, M (1997) First characterization of the phosphonoacetaldehyde hydrolase gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Gene*. 197:405-412.

Elkarrach, K; Merzouki, M; Atia, F; Laidi, O & Benlemlih, M (2021) Aerobic denitrification using *Bacillus pumilus*, *Arthrobacter* sp., and *Streptomyces lusitanus*: Novel aerobic denitrifying bacteria. *Rev Elsevier*. 14: 100663.

Evans, R & Lange, O (2001). *Biological Soil Crusts and Ecosystem Nitrogen and Carbon Dynamics*. SpringerLink. 150:263-279.

Ezpeleta, C; Barrios, J & Delgado, A (2012) Control microbiológico ambiental. *Rev Elsevier*. 31: 396- 401.

Fernández, M (2016) Colonización microbiana y sucesión primaria en suelos descubiertos tras el retroceso de glaciares en tierra del fuego, Chile. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

Ferousi, C; Schmitz, R; Maalcke, W; Jetten, M; Reimann, J & Kartal, B (2021) Characterization of a nitrite-reducing octaheme hydroxylamine oxidoreductase that lacks the tyrosine cross-link. *Rev Journal of biological chemistry*. 296: 100476.

Field, S; Thorndycroft, F; Matorin, A; Richardson, D & Watmough, N (2008) The Respiratory Nitric Oxide Reductase (NorBC) from *Paracoccus denitrificans*. *Elsevier*. 437: 79-101.

Filloux, A; Bally, M & Soscia, C (1988) Phosphate regulation in *Pseudomonas aeruginosa*: Cloning of the alkaline phosphatase gene and identification of *phoB* and *phoR* like genes. *Rev Mol Gen Genet*. 212: 510–513.

Fitzgerald, C; Camejo, P; Oshlag, Z & Noguera, D (2015) Ammonia-oxidizing microbial communities in reactors with efficient nitrification at low-dissolved oxygen. 70: 38-51.

Fox, G. E., Wisotzkey, J. D., & Jurtschuk, P. (1992). How Close Is Close: 16S rRNA Sequence Identity May Not Be Sufficient To Guarantee Species Identity. *Int J Syst Bacteriol*. Jan;42(1):166-70.

Frébort, I; Kowalska, M; Hluska, T; Frébortova, J & Galuszka, P (2011) Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Rev Journal of Experimental Botany*. 8: 2431-2452.

Frkova, Z; Pistocchi, C; Vystavna, Y; Capkova, K; Dolezal, J & Tamburini, F (2022) Phosphorus dynamics during early soil development in a cold desert: insights from oxygen isotopes in phosphate. *SOIL An interactive open-access journal*. 8:1-15.

Gaby, J & Buckley, D (2012) A Comprehensive Evaluation of PCR Primers to Amplify the *nifH* Gene of Nitrogenase. *Public Library of Science (PLoS) ONE*. 7: 1-12.

Gajdosová, S; Spíchal, L; Kamínek, M; Hoyerová, K; Novák, O; Dobrev, P; Galuszka, P; Klíma, P; Gaudinová, A; Zizková, E; Hanus, J; Dancá, M; Trávníček, B; Pesek, B; Krupicka, M; Vanková, R; Strnad, M & Motyka, V (2011) Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of cis-zeatin-type cytokinins in plants. *Journal of Experimental Botany*. 62: 2827–2840.

Gamalero, E & Glick, B (2011) Mechanisms Used by Plant Growth-Promoting Bacteria. Rev Bacteria in Agrobiol: Plant Nutrient Management. 1: 17-46.

Garboza, F; Frontado, R; Noguera, N; Ávila, H; Ojeda, L; Ramírez, N; Triana, H & Triana, F (2011) Uso de medios alternativos a base de hidrolizado de caseína y extracto de *Aspergillus niger* y su efecto sobre la expresión genética de una cepa de *Escherichia coli*. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 31: 1-12.

Glaeser S & Kämpfer P (2015) Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. Systematic and Applied Microbiology, Volume 38, Issue 4: 237-245.

Glick, B (2012) Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Rev Hindawi Publishing Corporation Scientifica. 1: 1-15.

Godínez-Álvarez, H; Morin, C & Rivera-Aguilar, V (2012) Germination, survival and growth of three vascular plants on biological soil crusts from a Mexican tropical desert. Plant Biology. 14:157-162.

Goodfellow, M. (1989) Genus *Rhodococcus*. Rev In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 4: 2362-2371.

Greene, A; Euzéby, J; Tindall, B & Patel, B (2007) Proposal of *Fronidhabitans* gen. nov. to replace the illegitimate genus name *Fronidicola* Zhang et al., 2007. Rev International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 59: 1-10.

Großkinsky, D; Edelsbrunner, K; Pfeifhofer, H; Van der Graaff, E & Roitsch, T (2013) *Cis*- and *trans*-zeatin differentially modulate plant immunity. Rev Plant Signaling & Behavior. 8: 7-16.

Guo, L; Wang, C & Fang, R (2022) Stronger effects of maize rhizosphere than phosphorus fertilization on phosphatase activity and phosphorus-mineralizing-related bacteria in acidic soils, Rhizosphere. Rev science direct. 23: 2452-2198.

Gupta, P; Rani, R; Usmani, Z; Chandra, A & Kumar, V (2019) Chapter 5: The Role of Plant-Associated Bacteria in Phytoremediation of Trace Metals in Contaminated Soils. Rev Elsevier. 1:69-76.

Hazarika, S & Thakur, D (2020) Chapter 21: Actinobacteria. Rev Beneficial Microbes in Agro-Ecology. 1: 443-476.

He, T; Xie, D; Li, Z; Ni, J & Sun, Q (2017) Ammonium stimulates nitrate reduction during simultaneous nitrification and denitrification process by *Arthrobacter arilaitensis* Y-10. Rev Elsevier. 239: 66-73.

Helmke, E & Weyland, H. (2004). Psychrophilic versus psychrotolerant bacteria-occurrence and significance in polar and temperate marine habitats. Cellular and molecular Biology. 50:553-561.

Hiba, C; Miloud, B; Rachid, D, Ahcene, B & Hakim, H (2017) Optimization of inorganic phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus sp.* isolated from wheat rhizospheric soil. Rev Research paper. 10: 142-150.

Hickey, W; Cheng, S; Chao, J & Zhao, C (2012) The phn island: a new genomic island encoding catabolism of polynuclear aromatic hydrocarbons. Rev Microbiol. 3: 1-20.

Hosseinkhani, B & Hosseinkhani, G (2009) Análisis de bacterias productoras de fitasa (*Pseudomonas sp.*) a partir de heces de aves y optimización de la producción de esta enzima. Rev Africana de Biotecnología. 8: 313-319.

Inkscape Project. (2020). *Inkscape*. Retrieved from <https://inkscape.org>

Junier, P; Kim, O; Junier, T; Ahn, T; Imhoff, J & Witzel, K (2009) Community analysis of betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria using the *amoCAB* operon. *Rev Applied Microbiology and Biotechnology*. 83: 175- 188.

Kandeler, E; Deiglmayr, K; Tscherko, D; Bru, D & Philippot, L (2006) Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* Genes of Denitrifying Bacteria during Primary Successions of a Glacier Foreland. *Rev Applied and Environmental Microbiology*. 72: 1-10.

Kanehisa, M; Furumichi, M; Sato, Y; Kawashima, M & Ishiguro-Watanabe, M (2023) KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Rev Nucleic Acids Res*. 51: 587-592.

Karnwal, A & Kaushik, P (2011) Cytokinin production by *Pseudomonas fluorescens* in the presence of rice root exudates. *Rev Archives of Phytopathology and Plant Protection*.44:1728-1735.

Kertesz, M; Elgorriaga, A & Amrhein, N (1991) Evidencia de dos enzimas distintas que degradan fosfonato (CP liasas) en *Arthrobacter sp.* GLP-1. *Rev Biodegradación*. 2:53-59.

Khasheii, B; Mahmoodi, P & Mohammadzadeh, A (2021) Siderophores: Importance in bacterial pathogenesis and applications in medicine and industry. *Rev Microbiol*. 250:126-140.

Kim, M; Oh, H; Park, S & Chun, J (2014) Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Rev Int.J.Syst.Evol*. 64: 346-351.

Kim, S; Lim, J; Ahn, J; Weon, H; Hamada, M; Suzuki, K; Ahn, T & Kwon, S (2014) Description of *Galbitalea soli* gen. nov., sp. nov., and *Fronidihabitans sucicola* sp. nov. *Rev International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64: 1-10.

Koenig, R; Morris, R & Polacco, J (2002) tRNA Is the Source of Low-Level *trans*-Zeatin Production in *Methylobacterium spp.* *Rev Journal of Bacteriology*. 184: 7-18

Kong, Z & Hongguang, L (2022) Modification of Rhizosphere Microbial Communities: A Possible Mechanism of Plant Growth Promoting Rhizobacteria Enhancing Plant Growth and Fitness. *Front. Plant Sci*. 13: 1-11.

Konietzny, U; Greiner, R & Waldstrasse, D (2004) Bacterial phytase: potential application, in vivo function and regulation of its synthesis. *Rev Brazilian Journal of Microbiology*. 35:11-18.

Kononova, S & Nesmeyanova, M (2002) Fosfonatos y su degradación por microorganismos. *Rev Bioquímica*. 67: 184-195

Kostera, J; McGarry, J & Pacheco, A (2010) Enzymatic Interconversion of Ammonia and Nitrite: The Right Tool for the Job. *Rev Biochemistry*. 49: 8546-8553.

Kour, D; Rana, K & Sheikh, I (2020) Alivio del estrés por sequía y promoción del crecimiento vegetal por *Pseudomonas libanensis EU-LWNA-33*, una bacteria solubilizadora de fósforo que se adapta a la sequía. *Rev Biol.Ciencia*. 90: 785-795.

Kramer, J; Özkaya, Ö & Kümmerli, R (2020) Bacterial siderophores in community and host interactions. *Rev Nat Microbiol*. 18: 152-163.

Kuzyk, S; Hughes, E & Yurkov, V (2021) Discovery of Siderophore and Metallophore Production in the Aerobic Anoxygenic Phototrophs. *Rev Microorganisms*. 9: 959-968.

LaTorre, N (2007) Evaluación de medios de cultivos altos y bajos en nutrientes para la recuperación de heterótrofos edáficos en la ecorregión cafetera de los Andes. Tesis de Licenciatura en Microbiología industrial.

Lee, D (2010) *Fronidihabitans peucedani* sp. nov., an actinobacterium isolated from rhizosphere soil, and emended description of the genus *Fronidihabitans* Greene et al. 2009. *Rev International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60: 1-10.

Liang, J; Liu, J & Jia, P. (2020) Novel phosphate-solubilizing bacteria enhance soil phosphorus cycling following ecological restoration of land degraded by mining. *ISME*. 14: 1600–1613.

Liu, Q; Tian, J; Liu, H; Zhou, Y & Xin, Y (2019) *Cryobacterium melibiosiphilum* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from glacier ice. *Rev international journal of systemactic and evolutionary microbiology*. 69: 1-10.

Liu, Q; Xin, Y; Chen, X; Liu, H; Zhou, Y & Chen, X (2018) *Cryobacterium aureum* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from glacier ice collected from the ice tongue surface. *Rev Int J Syst Evol Microbiol*. 68: 1173-1176.

Liu, Q; Yang, L & Xin, Y (2023) Diversity of the genus *Cryobacterium* and proposal of 19 novel species isolated from glaciers. *Rev Front. Microbiol*. 14: 1-17.

Llambí, L; Melfo, A; Gámez, L; Pelayo, R; Cárdenas, M; Rojas, C; Torres, J; Ramírez, N; Huber, B & Hernández J (2021) Vegetation Assembly, Adaptive Strategies and Positive Interactions During Primary Succession in the Forefield of the Last Venezuelan Glacier. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 9:1-15.

Lombardino, J; Bijlani, S; Singh, N; Wood, J; Barker, R; Gilroy, S; Wang, C & Venkateswaran, K (2022) Genomic Characterization of Potential Plant Growth-Promoting Features of *Sphingomonas* Strains Isolated from the International Space Station. *Rev Microbiology Spectrum*. 10: 1-10.

Lopes, M; Dias, M & Gurgel, E. (2021) Successful Plant Growth-Promoting Microbes: Inoculation Methods and Abiotic Factors. *Rev Front. Sustain. Food Syst*. 5: 1-13.

López, G; Fernández, S; Cárdenas, R & Sánchez, J. (2005) Antagonismo microbiano contra bacterias activadoras de núcleos de hielo: *Pantoea agglomerans* y *Pseudomonas syringae* Van Hall. *Rev Chapingo Serie Horticultura*. 11: 105-111.

Lukesch, M; Tasnádi, G; Ditrach, K; Hall, M & Faber, K (2020) Characterization of alkaline phosphatase PhoK from *Sphingomonas* sp. *BSAR-1* for phosphate monoester synthesis and hydrolysis. *Rev Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 1868: 140-148.

Ma, S; Huang, S; Tian, Y & Lu, X (2022) Heterotrophic ammonium assimilation: An important driving force for aerobic denitrification of *Rhodococcus erythropolis* strain Y10. *Rev Elsevier*. 291: 132910.

MacDonald, E; Powell, G; Regier, D; Glass, N; Franciso, R; Kosuge, T & O.Morris, R (1986) Secretion of Zeatin, Ribosylzeatin, and Ribosyl-1"-Methylzeatin by *Pseudomonas savastanoi*: Plasmid-Coded Cytokinin Biosynthesis. *Rev Plant Physiology*. 82: 742-747.

Machado, N (2020) Diversidade e distribuição de cianobactérias de crostas biológicas do bioma caatinga com base em taxonomia polifásica e análise metagenômica. (Tesis de doctorado) Universidade estadual paulista "Julio de Mesquita Filho" Campus de Sao José do rio Preto.

Magallanes, X (2014) Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias psicrófilas que colonizan el glaciar Sinigüis (Pico Humboldt y Bonpland) (Estado Merida, Venezuela). (Tesis de licenciatura). Universidad de los Andes.

Maier, S, Muggia, L, Kuske, CR & Grube, M (2016). Bacterias y hongos no liquenizados dentro de las costras biológicas del suelo. *Estudios ecológicos*. 1:81–100.

Martínkova, L; Uhnáková, B; Pátek, M; Nešvera, J & Kré V (2009) Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Rev Elsevier*. 35: 162-177.

Miteva, V (2008) Bacteria in snow and Glacier Ice Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology. *SpringerLink* 1: 31-32.

- Monds, R; Newell, P; Schwartzman, J & O'Toole, G (2006). Conservation of the Pho regulon in *Pseudomonas fluorescens Pf0-1*. *Rev Microbiología Aplicada y Ambiental*.72: 1-12.
- Moreno, L; López, M & Cruz, F (2018) Solubilización de fosfatos por bacterias del género *Burkholderia* aisladas de oxisoles de la altillanura colombiana. *Rev Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*. 22: 1-103.
- Morita, R (1975) Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 39: 146- 167.
- Mukhametzyanova, A; Akhmetova, A & Sharipova, M (2011) Microorganisms as Phytase Producers. *Rev Microbiology*. 81: 267-275.
- Mullen, M (2019) Phosphorus in Soils Biological Interactions. *Rev Elsevier*. 9:1-8.
- Muñoz, M; Delgado, M & Lucas, M (2021) La biodiversidad y el carbono orgánico del suelo son esenciales para revertir la desertificación. *Rev científica de ecología y medio ambiente*. 30: 1-10.
- Murugappan, R; Karthikeyan, M; Aravinth, A & Alamelu, M (2012) Siderophore-Mediated Iron Uptake Promotes Yeast–Bacterial Symbiosis. *Rev Appl Biochem Biotechnol*. 168:2170–2183.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) (1988) National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; Bethesda (MD). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nelson, D & Cox, M (2009) *Lehninger: principios básicos de bioquímica*. Quinta edición.
- Nett, R; Montanares, M; Marcassa, A; Lu, X; Nagel, R; Charles, T; Hedden, P; Rojas, M & Peters, R (2017) Elucidation of gibberellin biosynthesis in bacteria reveals convergent evolution. *Rev Nat Chem Biol*. 13: 69-74.
- Nilgiriwala, K; Alahari, A; Sambasiva, A & Kumar, S (2008) Cloning and Overexpression of Alkaline Phosphatase PhoK from *Sphingomonas sp. Strain BSAR-1* for Bioprecipitation of Uranium from Alkaline Solutions. *Rev Applied and Environmental Microbiology*. 74: 1-17.
- Olanrewaju, O; Glick, B & Babalola, O (2017) Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *Rev World J Microbiol Biotechnol*. 197: 1-16.
- Orobio, A & Rozo, J (2019) Caracterización de factores promotores de crecimiento vegetal de *Pseudomonas* psicrófilas y su efecto en la promoción de crecimiento en tomate (*Solanum lycopersicum*). Tesis de licenciatura para biología. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
- Paredes, M & Espinosa, V (2010) Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Rev Terra Latinoamericana*. 28: 61-70.
- Patten, C & Glick, B (1996) Bacterial Biosynthesis of Indole-3-Acetic Acid. *Canadian Journal of Microbiology*. 42: 207-220.
- Pérez, E; Sulbarán, M; Ball, M & Yarzabal, L (2007) Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biology and Biochemistry*. 39:2905–2914.
- Pérez, S; Coto, O; Echemendía, M & Ávila, G (2015) *Pseudomonas fluorescens*, biological control or pathogen? *Rev Protección Veg*. 30: 1-15.
- Pertry, I; Clavíková, K; Depuydt, S; Galuszka, P; Spíchal, L; Temmerman, W; Stes E; Schmuling, T; Kakimoto, T; Van Montagu, M ; Strnad, M; ,Holsters, M; Tarkowski, P and Vereecke, D (2009) Identification of *Rhodococcus fascians* cytokinins and
- Pezoa, M (2021) Microorganismos solubilizadores de fosfato y mineralizadores de fósforo asociados a líquenes *Peltigera* del Parque Nacional Patagonia. Disponible en <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/181521>

Postma, J; Nijhuis, E & Someus, E (2010) Selection of phosphorus solubilizing bacteria with biocontrol potential for growth in phosphorus rich animal bone charcoal. *Rev Applied Soil Ecology*. 46: 464-469.

Priscu, J; Christner, B; Foreman, C & Royston, B (2007) Biological material in ice cores. *Encyclopedia of Quaternary Sciences*. 1:1-34.

Pruitt, K; Tatusova, T; Brown, G & Maglott, D (2012) NCBI Reference Sequences (RefSeq): current status, new features and genome annotation policy. *Rev Nucleic Acids*. 40: 130-135.

Quast, C; Pruesse, E; Yilmaz, P; Gerken, J; Schweer, T; Yarza, P; Peplies, J & Glöckner, F(2013) El proyecto de base de datos de genes de ARN ribosómico SILVA: procesamiento de datos mejorado y herramientas basadas en web.Núcleo. *Ácidos res*. 41 (D1): D590-D596. Disponible en: <https://www.arb-silva.de/>

Quinn, J; Kulakova, A; Cooley, N & McGrath, J (2007) Nuevas formas de romper un viejo vínculo: las hidrolasas bacterianas de carbono-fósforo y su papel en el ciclo biogeoquímico del fósforo. *Rev Environmental Microbiology*. 9: 2392-2400.

Ragot, S; Kertesz, M & Bunemann, E (2015) Diversidad del gen de la fosfatasa alcalina *phoD* en el suelo. *Rev Microbiología Aplicada y Ambiental*. 81: 20-29.

Ragot, S; Kertesz, M & Bunemann, E (2015). *PhoD Alkaline Phosphatase Gene Diversity in Soil*. *Appl. Environ. Microbiol*. 81: 7281–7289.

Ramírez, N; Melfo, A; Resler, L & Llambí, L (2020) The end of the eternal snows: integrative mapping of 100 years of glaciers retreat in the Venezuelan Andes. *Arctic, Antarctic and Alpine Research*. 52: 563-581.

Raymond, J; Siefert, J; Staples, C & Blankenship, R (2004) The Natural History of Nitrogen Fixation. *Rev Molecular Biology and Evolution*. 21: 541-554.

Reasoner, D & Geldreich, E. (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol*. 49: 1-7.

Reddy, G; Pradhan, S; Manoramal, R & Shivajil, S (2010) *Cryobacterium roopkundense* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from glacial soil Free. *Rev International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60: 1-10.

Restrepo, G; Moreno, S; Pérez, Y; Díaz, A; Baldani, L & Hernández, A (2014) Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Rev CENIC Ciencias Biológicas*. 46: 63-76.

Ribaudó, C; Riva, D; Curá, J; Ponds, C; Granell, R & Cantora, M (2013) Etileno como mediador de los mecanismos directos e indirectos de la promoción del crecimiento vegetal ejercido por rizobacterias. *Rev Rizósfera, biodiversidad y agricultura sustentable*. 6:978-987.

Richardson, D; Spanning, R & Ferguson, S (2007) The Prokaryotic Nitrate Reductases. Chapter 2: *Biology of the Nitrogen Cycle*. 1: 21-35.

Rissanen, A; Karvinen, A; Nyk, H; Peura, S; Tirola, M; Maki, A & Kankaala, P (2017) Effects of alternative electron acceptors on the activity and community structure of methane-producing and consuming microbes in the sediments of two shallow boreal lakes. *Rev FEMS Microbiology Ecology*. 93: 1-16.

Rives, N; Acebo, Y & Hernández, A (2007) Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). *Perspectivas de su uso en cuba*. *Rev Cultivos tropicales*. 28: 29-38.

Romanovskaia, V; Parfenova, V & Bel'kova, N (2014) Phylogenetic analysis of bacteria of extreme ecosystems. *Rev Mikrobiolohichnyi Zhurnal*. 76: 2-10.

Rondón, J; Ball, M; Castro, T & Yarzabal, L (2019) Eurypsychrophilic *Pseudomonas* spp. isolated from Venezuelan tropical glaciers as promoters of wheat growth and biocontrol agents of plant pathogens at low temperatures. *Rev Environmental Sustainability*. 2:1-11.

Rondón, J; Gómez, W; Ball, M; Melfo, A; Rengifo, M, Balcázar, W; Dávila-Vera, D; Balza-Quintero, A; Mendoza-Briceño, R & Yarzabal, L (2016) Diversity of culturable bacteria recovered from Pico Bolívar's glacial and subglacial environments, at 4950 m, in Venezuelan tropical Andes. *Canadian Journal of Microbiology*. 62:1-14.

Sajeed, S & Vidhale, N (2013) Bacterial Siderophore and their Application: A review. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*. 2: 303-312.

Salamanca, A (2011) El ocaso de los glaciares. *DRABA ICM*. 53: 46-54.

Saleh, S; Shannon, K; Henderson, S; Goyer, C; Trevors, J; Zebarth, B & Burton, D (2009) Effect of pH and Temperature on Denitrification Gene Expression and Activity in *Pseudomonas mandelii*. *Rev Applied and Environmental Microbiology*. 75: 1-10.

Sampaio, S; Simões De Araujo, V; Silva, L ; Divan, V & Baldani, J (2009) Occurrence and diversity of nitrogen-fixing *Sphingomonas* bacteria associated with rice plants grown in Brazil. *Rev FEMS Microbiology Letters*. 293: 11-19.

Sánchez, J (2018) Identificación de bacterias productoras de giberelinas presentes en plantas de *Stanophea tigrina* con efecto promotor de crecimiento vegetal. *Rev repositorio institucional*. 1: 1-15.

Santos, F (2015) The *Pho* regulon: a huge regulatory network in bacteria. *Rev Front. Microbiol*. 6:402-412.

Santos, M; Bernardino, M & Cajueiro, E (2021) Successful Plant Growth-Promoting Microbes: Inoculation Methods and Abiotic Factors. *Front. Plant Sci*. 5: 1-13.

Sattler, B; Puxbaum, H & Psenner, R (2001) Bacterial growth in supercooled cloud droplets. *Geophysical Research Letters*. 28: 239-242.

Sayavedra, L ; Hommes, N; Alzerreca, J; Arp, D; Norton, J & Klotz, M (1998) Transcription of the *amoC*, *amoA* and *amoB* genes in *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosospira* sp. NpAV. *Rev FEMS Microbiology Letters*. 167: 81-88.

Scala, D & Kerkhof, L (1998) Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three *nosZ* genes from marine sediments. *Rev FEMS Microbiology Letters*. 162: 61-68.

Schmid, M; Hooper, A; Klotz, M; Woebken, D; Lam, P; Kuypers, M; Pommerening, A; Op Den Camp, H & Jetten, M (2008) Environmental detection of octahaem cytochrome c hydroxylamine/hydrazine oxidoreductase genes of aerobic and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Rev Environmental Microbiology*. 10: 3140-3149.

Schwartzman, D & Volk, T (1989) Biotic enhancement of weathering and the habitability of Earth. *Letters to Nature*. 340: 457-460.

Selvapandiyani, A & Bhatnagar, R (1994) Aislamiento de una *Pseudomonas* que metaboliza el glifosato: detección, purificación parcial y localización de carbono-fósforo liasa. *Rev Appl Microbiol Biotechnol*. 40: 876-882.

Selvapandiyani, A & Bhatnagar, R (1994) Clonación de genes que codifican la CP liasa de aislados de *Pseudomonas PG2982* y *GLC11*: identificación de un alelo críptico en el cromosoma de *P. aeruginosa*. *Rev Microbiología*. 29: 255-261.

Sethi, M; Kaur, C; Parvaiz, R & Prabha, M (2023) Chapter 10: Endophyte mediated plant health via phytohormones and biomolecules. *Rev Microbial Endophytes and Plant Growth*. 1: 151-166.

Siddiqui, R; Warnecke-Eberz, U; Hengsberger, U; Schneider, B; Kostka, S & Friedrich, B (1993) Structure and function of a periplasmic nitrate reductase in *Alcaligenes eutrophus* H16. *Rev J Bacteriol.* 175: 5867-5876.

Smibert, R & Krieg, N (1994) Phenotypic characterization, p. 615. In P. Gerhardt, R. Murray, W. Wood, and N. Krieg, *Methods for general and molecular bacteriology*. ASM Press, Washington, DC.

Sodergren, E; Hsu, P & DeMoss, J (1988) Roles of the *narJ* and *narI* gene products in the expression of nitrate reductase in *Escherichia coli*. *Rev Journal Biological Chemistry.* 263: 16156-16162.

Spíchal, L (2012) Cytokinins recent news and views of evolutionally old molecules. *Rev Functional Plant Biology.* 39: 267–284.

Stackebrandt, E; Goebel BM (1994) Taxonomic note: a place for DNA–DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 44, 846–849.

Strahler, A (1970) *Introducing physical geography*. 6th Edition.

Su, J; Yeh, K & Tseng, P (2006) A strain of *Pseudomonas* sp. Isolated from Piggery Wastewater Treatment Systems with Heterotrophic Nitrification Capability in Taiwan. *Rev Curr Microbiol.* 53, 77–81.

Sugawara, S; Hishiyama, S; Jikumaru, Y & Kasahara, H (2009) Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Rev PNAS.* 106: 5430-5435.

Sukweenadhi, J; Kim, Y & Kang, C (2015) *Sphingomonas panaciterrae* sp. nov., una bacteria promotora del crecimiento vegetal aislada del suelo de un campo de ginseng. *Rev Arco Microbiol.* 197: 973–981

Suzuki, K; Sasaki, J; Uramoto, M ; Nakase, T & Komagata, K (1997) *Cryobacterium psychrophilum* gen. nov., sp. nov., nom. rev., comb. nov., an obligately psychrophilic actinomycete to accommodate "*Curtobacterium psychrophilum*" Inoue and Komagata 1976. *Rev Int J Syst Bacteriol.* 47: 474-478.

Taller, B & Wong, T (1989) Cytokinins in *Azotobacter vinelandii* Culture Medium. *Rev Applied and Environmental Microbiology.* 55:1-13

Tapia, I; Sánchez, R; Arroyo, M; Lira, R; Sánchez, R; del Rayo, C; Padilla, D; Batista, R & Folch-Mallol, J (2019) Isolation and characterization of psychrophilic and psychrotolerant plant-growth promoting microorganisms from a high-altitude volcano crater in Mexico, *Microbiological Research.* 3:1-38.

Tapia, Y & García, F (2013) Phosphorus availability is a product of soil bacterial activity in oligotrophic ecosystems: A critical review. *Rev Terra latinoamericana.* 31: 231-242.

The UniProt Consortium UniProt (2023) The Universal Protein Knowledgebase. *Rev Nucleic Acids.* 51: 523–531

Timofeeva, A; Galyamova, M & Sedykh, M (2022) Bacterial Siderophores: Classification, Biosynthesis, Perspectives of Use in Agriculture. *Rev Plants.* 11: 30-65.

Toro, J; García, A & Romero, L (2008) Efecto del calentamiento global. Nieves eternas en la sierra Nevada de Mérida. Comunicado en encuentro con la ciencia, festival VII y IX. Facultad de ciencias, Universidad de los Andes.

Uden, G & Bongaerts, J (1997) Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Rev Biochimica et Biophysica.* 1320: 217-234.

Van Wonderen, J; Oganesyanyan, V; Watmough, N; Richardson, D; Thomson, A & Cheesman, M (2013) Unexpected weak magnetic exchange coupling between haem and non-haem iron in the catalytic site of nitric oxide reductase (NorBC) from *Paracoccus denitrificans*. Rev Biochem J. 451: 389-394.

Vardhan, V; Bhattacharya, A & Pandey, A (2023) Chapter 1: Plant growth promoting microbiomes: History and their role in agricultural crop improvement. Plant-Microbe Interaction. Rev Advances in Molecular and Biochemical Approaches. 1: 1-44.

Vega, P; Canchignia, H ; Gonzales, M & Seeger, M (2016) Biosynthesis of indole-3-acetic acid and plant growth promoting by bacteria. Rev cultrop. 37: 1-15.

Velasco, J; Castellanos, H; Acevedo, G; Clarenc, R & Rodriguez, A (2019) Rhizospheric bacteria with potential benefits in agriculture. Rev Terra latinoamericana. 38: 333-345.

Verstraete, W & Alexander, M (1972) Mechanism of Nitrification by *Arthrobacter* sp. Rev Journal of Bacteriology. 110: 1-10.

Vuille, M; Francou, B; Wagnon, P; Irmgard, J; Kaser, J; Marca, B & Bradley, R (2008) Climate change and tropical Andean glaciers: past, present and future. ElSevier. 89:79-96.

Vuille, M; Franquist, E; Garreaud, R; Lavado, W & Cáceres, C (2015) Impact of the global warming hiatus on Andean temperature. J Geophys Res-Atmos 120:3745-3757.

Vuille, M; Sicart, J.-E; Huggel, C; Scheel, M; Lejeune, Y; Arnaud, Y; Collet, M; Condom, T; Consoli, G; Favier, V; Jomelli, V; Galarraga, R; Ginot, P; Maisincho, L; Mendoza, J; Ménégoz, M; Ramírez, E; Ribstein, P; Suarez, W; Villacis, M & Wagnon, P (2012) Current state of glaciers in the tropical Andes: a multi-century perspective on glacier evolution and climate change, The Cryosphere. 7:81–102.

Wang, J; Chen, P; Li, S; Zheng, X; Zhang, C & Zhao, W (2022) Mutagenesis of high-efficiency heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacterium *Rhodococcus* sp. strain CPZ 24. Rev Elsevier. 361: 127692.

Weber, B; Belnap, J; Budel, B ; Antoninka,A; Barger, N; Chaudhary,B; Darrouzet,A; Eldridge,D; Faist, A; Ferrenberg, S; Havrilla, C; Huber, E; Malam, O; Maestre, F; Reed, S; Rodriguez, E; Tucker, C; Young, K; Zhang, Y; Zhao, Y; Zhou, X & Bowker, M (2022) What is a biocrust? A refined, contemporary definition for a broadening research community. Rev Cambridge Philosophical Society. 97: 1768-1785.

Weimin, C; Fan, Y; Lu, Z & Junman, W (2016) Organic Acid Secretion and Phosphate Solubilizing Efficiency of *Pseudomonas* sp. *PSB12*: Effects of Phosphorus Forms and Carbon Sources. Rev Geomicrobiology Journal. 33: 870-877.

Weingart, H & Volksch, B (1996) Ethylene Production by *Pseudomonas syringae* Pathovars *In Vitro* and *In Planta*. Rev Applied and environmental microbiology. 63: 156-161.

Weisburg, W; Barns, S; Pelletier, D & Lane, D (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Bacteriol Rev. 173: 697-703.

Werra, P; Pechy, M; Keel, C & Maurhofer, M (2009) Role of Gluconic Acid Production in the Regulation of Biocontrol Traits of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Rev ASM Journals Applied and Environmental Microbiology. 75: 12.

White, D; Sutton, S & Ringelberg, D (1996) The genus *Sphingomonas*: physiology and ecology. Rev Elsevier. 7: 301-306.

Xei, C & Yokota, A (2006) *Sphingomonas azotifigens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of *Oryza sativa*. Int J Syst Evol Microbiol. 56: 889-893.

Xie, F; Thiri, M & Wang, H (2021) Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel isolated *Pseudomonas mendocina* X49. Rev Elsevier. 319: 124198.

Yarza, P; Yilmaz, P; Pruesse, E; Glöckner, F; Ludwig, W; Schleifer, K; Whitman, W; Euzéby, J; Amann, R & Roselló-Mora, R (2014) Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol.* 12: 635–645.

Yarzabal, L (2010). Agricultural Development in Tropical Acidic Soils: Potential and Limits of Phosphate-Solubilizing Bacteria. *Rev Soil Biology and Agriculture in the Tropics.* 21: 209–233.

Yarzabal, L (2021) Bioprospecting Extreme Ecosystems Before They Vanish: the (Poorly Studied). *Microbiology of Tropical Glaciers. Extreme Environments.* 1:1-17

Yun, L; Yu, Z; Li, Y; Luo, P; Jiang, X; Tian, Y & Ding, X (2019) Ammonia nitrogen and nitrite removal by a heterotrophic *Sphingomonas* sp. strain LPN080 and its potential application in aquaculture. 500: 477- 484.

Zehr, J; Jenkins, B; Short, S & Steward, G (2003) Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Rev Environmental microbiology.* 5: 539-554.

Zemp, M & Van, W (2008) Global Glacier Changes Facts and Figures. *WGMSUNEP.* 1:1-23.

Zhang, J; Wu, P; Hao, B & Yu, Z (2011) Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001. *Rev Elsevier.* 102: 9866-9869.

Zhang, M; Pan, L; Liu, L; Su, C; Dou, L; Su, Z & He, Z (2020) Phosphorus and nitrogen removal by a novel phosphate-accumulating organism, *Arthrobacter* sp. HHEP5 capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification: Safety assessment, removal characterization, mechanism exploration and wastewater treatment. *Rev Elsevier.* 312: 123633.

Zhang, M; Ren, Y; Jiang, W; Wu, C; Zhou, Y; Wang, H; Ke, Z; Gao, Q; Liu, X; Qiu, J & Hong, Q (2020) Comparative genomic analysis of iprodione-degrading *Paenarthrobacter* strains reveals the iprodione catabolic molecular mechanism in *Paenarthrobacter* sp. strain YJN-5. *Rev Environmental Microbiology.* 23: 1079-1095.

Zimmer, A; Meneses, R; Rabatel, A; Soruco, A & Anthelme, F (2014) Characterizing the upward migration of high-Andean plant communities under the effects of global warming with early post-glacial chronosequences. *Rev Ecología en Bolivia.* 49: 27-41.

Anexos

Tabla 6. Presencia (1) o ausencia (0) de los genes involucrados en las diferentes subrutinas del ciclo global del nitrógeno. Se muestran los sustratos y productos de las enzimas codificadas por los genes nombrados, para cada uno de los géneros encontrados en las biocostras. En algunos casos, el nombre del gen corresponde a un código numérico que representa la enzima codificada por el gen. Los nombres de los géneros se resumen así: A=Arthrobacter, S=Sphingomonas, F=Frondihabitans, C=Cryobacterium, R=Rhodococcus, Ps=Pseudomonas.

Sustrato/Producto	Gen	A	S	F	C	R	Ps
Nitrato extracelular a nitrato intracelular	<i>nrt</i>	0	0	0	1	1	1
	<i>NrtABCD</i>	0	0	0	0	0	1
Nitrato a nitrito	<i>nr</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>narB</i>	0	0	0	0	0	1
	<i>narG, narZ, nxrA</i>	1	1	0	1	1	1
	<i>napA</i>	0	1	0	0	0	1
Nitrito a óxido nítrico	<i>narG, narZ, nxrA</i>	1	1	0	1	1	1
	<i>nirK</i>	0	1	0	1	1	1
Nitroalcano a nitrito	<i>ncd2, npd</i>	1	1	0	0	1	1
	<i>NAO</i>	0	0	0	0	1	0
Óxido nítrico a óxido nitroso	<i>norBC</i>	0	1	0	0	1	1
	<i>CYPSS</i>	0	0	0	0	0	0
Nitrito a amonio	<i>nit6</i>	1	1	0	1	1	1
	<i>nirA</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>nirB</i>	1	1	0	1	1	1
	<i>nrfA</i>	0	0	0	0	0	1
Hidroxilamina a nitrito	<i>hao</i>	0	0	0	0	0	0

	<i>hao</i>	0	0	0	0	0	0
Óxido nítrico a nitrógeno	<i>nosZ</i>	0	1	0	1	1	1
Óxido nítrico a hidrazina	<i>K20932</i>	0	0	0	0	0	0
Hidroxilamina a amonio	<i>R00143</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>hcp</i>	0	1	0	0	1	1
Hidrazina a nitrógeno	<i>hdh</i>	0	0	0	0	0	1
Amonio a hidroxilamina	<i>PmoA-amoA</i>	0	1	0	0	1	0
Nitrógeno a amonio	<i>nifD</i>	0	1	0	0	0	1
	<i>vnfD</i>	0	1	0	0	0	0
	<i>R05186</i>	0	0	0	0	0	0
Formamida a amonio	<i>K01455</i>	0	0	0	1	1	1
Nitrilo a amonio	<i>K01501</i>	0	0	0	0	1	1
CO ₂ a HCO ₃	<i>CA</i>	1	1	1	1	1	1
Cianato a carbamato	<i>cynS</i>	1	0	0	1	0	1
CarbamoylP a carbamato	<i>arcC</i>	0	0	1	0	1	1
Amonio a CarbomylP	<i>cpsI</i>	1	0	0	0	0	0
L glutamato a amonio y viceversa	<i>gudB, rocG</i>	1	1	0	0	1	1
	<i>GludI-2, gdhA</i>	1	1	0	0	1	1
	<i>gdhA</i>	1	1	0	1	1	1
Amonio a L glutamina	<i>glnA, GLUL</i>	1	1	1	1	1	1
L glutamina a L	<i>gltB</i>	1	1	1	1	1	1

glutamato							
	<i>glt1</i>	1	1	1	1	1	0
	<i>GLU, gltS</i>	1	1	0	0	1	0

Tabla S2. Presencia (1) o ausencia (0) de los genes involucrados en la síntesis de sideróforos para cada uno de los géneros estudiados. Se muestran los sustratos utilizados por cada una de las enzimas codificadas por dichos genes y sus productos. Los nombres de los géneros se resumen así: A=Arthrobacter, S=Sphingomonas, F=Frontrahabitans, C=Cryobacterium, R=Rhodococcus, Ps=Pseudomonas.

Sustrato/ Producto	Gen	A	S	F	C	R	Ps
Corismato a isocorismato	<i>pchA</i>	1	1	1	1	1	1
Isocorismato a salicilato	<i>pchB</i>	1	1	0	0	1	1
Isocorismato a 2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato	<i>entB</i>	1	1	0	0	1	1
2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato a 2,3-dihidroxibenzoato	<i>entA</i>	1	1	0	0	1	1
2,3-dihidroxibenzoato a enteroquelina	<i>dhbB</i>	1	1	1	1	1	1
3-dehidrochiquimato a 3,4-dihidroxibenzoato	<i>AsbF</i>	0	0	0	0	0	0
3,4-dihidroxibenzoato a (3,4-DHBA) adenilato	<i>AsbC</i>	0	0	0	0	0	0
(3,4-DHBA) acp asbd a 3,4-DHBA citril espermidina	<i>AsbE</i>	0	0	0	0	0	0
3,4-DHBA citril espermidina a 3,4-DHBA citril (bis) espermidina	<i>AsbB</i>	0	0	0	0	0	0

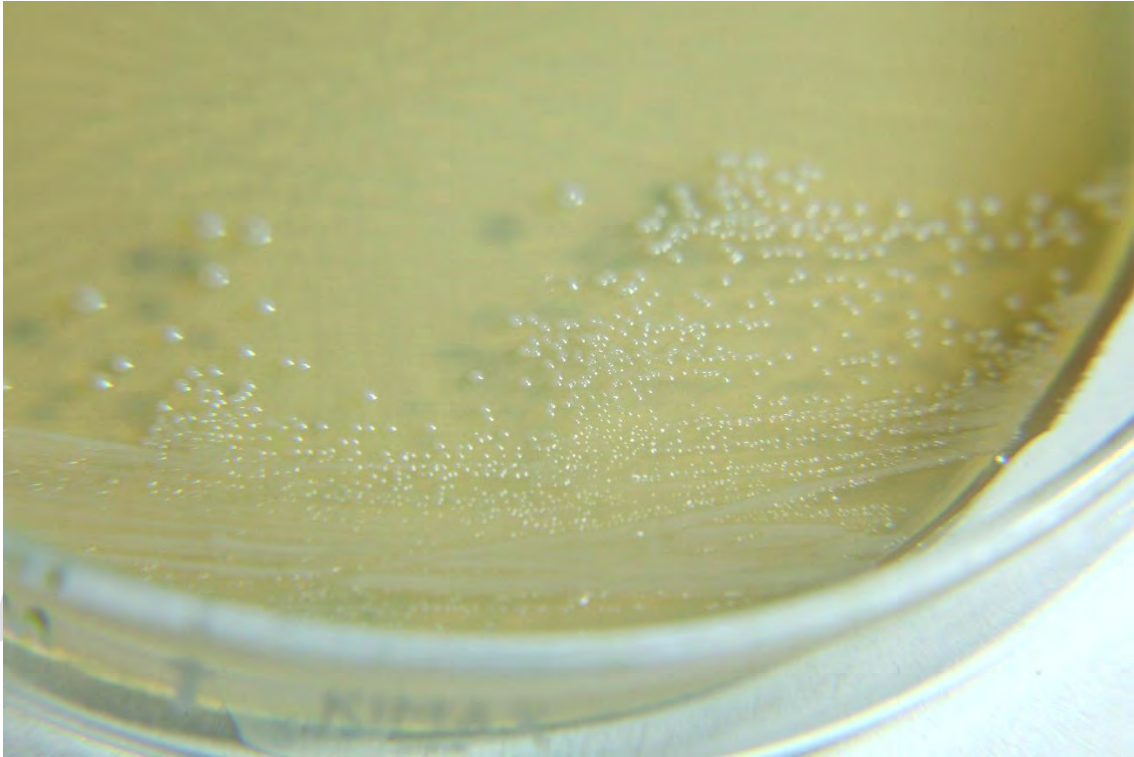
Espermidina a N-citril- espermidina	<i>AsbA</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>PchF</i>	1	1	0	0	1	1
	<i>PchG</i>	0	0	0	0	0	1
	<i>PchD</i>	1	1	0	0	1	1
	<i>PchE</i>	0	0	0	0	1	1
	<i>mbtA</i>	1	1	0	0	1	1
	<i>mbtB</i>	1	0	0	0	1	1
	<i>mbtE</i>	1	1	0	0	1	1
	<i>mbtC</i>	1	1	0	0	1	1
	<i>mbtD</i>	0	1	0	0	1	1
	<i>mbtF</i>	1	1	0	0	1	1
	<i>mbtG</i>	1	1	0	0	1	1
	<i>Irp5</i>	0	1	0	0	0	0
	<i>irp2</i>	0	0	0	0	1	1
	<i>irp3</i>	0	0	0	0	0	1
	<i>irp1</i>	0	1	0	0	1	1
	<i>entE</i>	1	1	0	0	1	1
	<i>dhbE</i>	1	1	0	0	1	1
	<i>vibE</i>	1	1	0	0	1	1
	<i>mxoE</i>	1	1	0	0	1	1
	<i>entB</i>	1	0	0	0	1	1
	<i>dhbB</i>	1	0	0	0	1	1
	<i>vibB</i>	1	0	0	0	1	1
	<i>mxoF</i>	1	0	0	0	1	1
	<i>vibF</i>	1	1	0	0	1	1
	<i>vibH</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>entF</i>	1	1	0	0	1	1
	<i>entH</i>	0	0	0	0	0	1
	<i>mxoG</i>	1	1	0	0	1	1

<i>dhbF</i>	1	1	0	0	1	1
<i>mxcl</i>	1	1	0	0	1	1

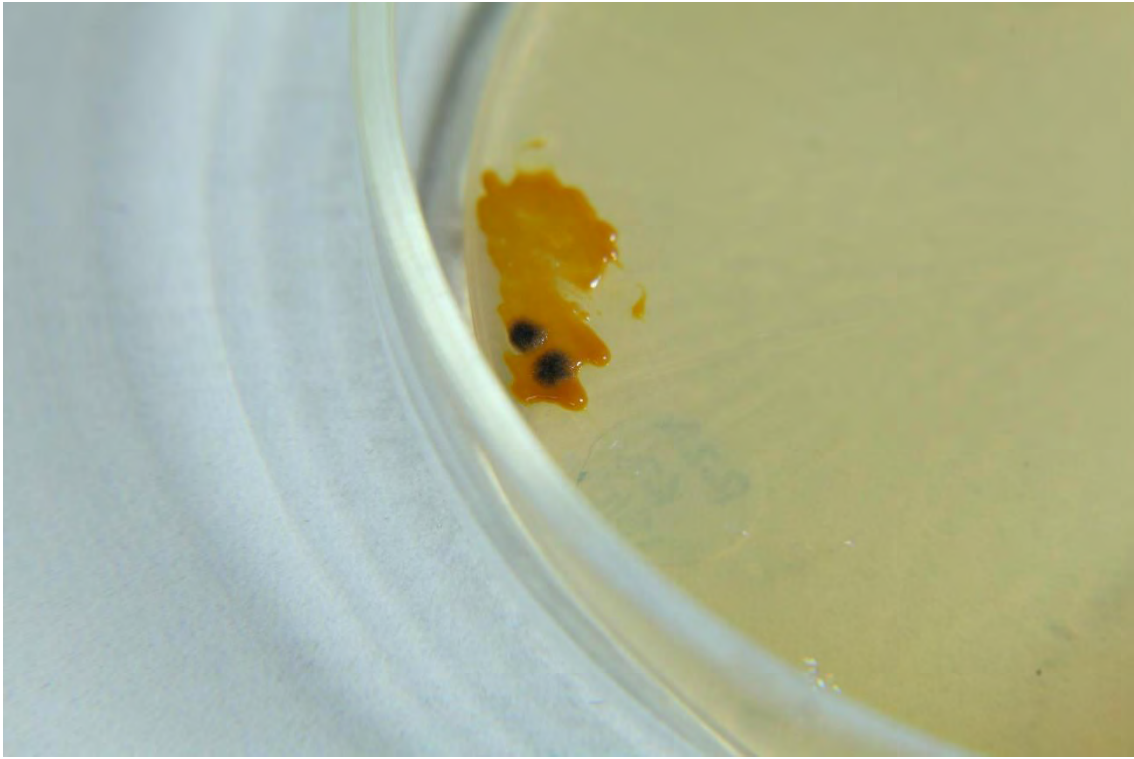
www.bdigital.ula.ve

Catálogo de fotos de colonias aisladas de biocostras del frente glacial del
Pico Humboldt.

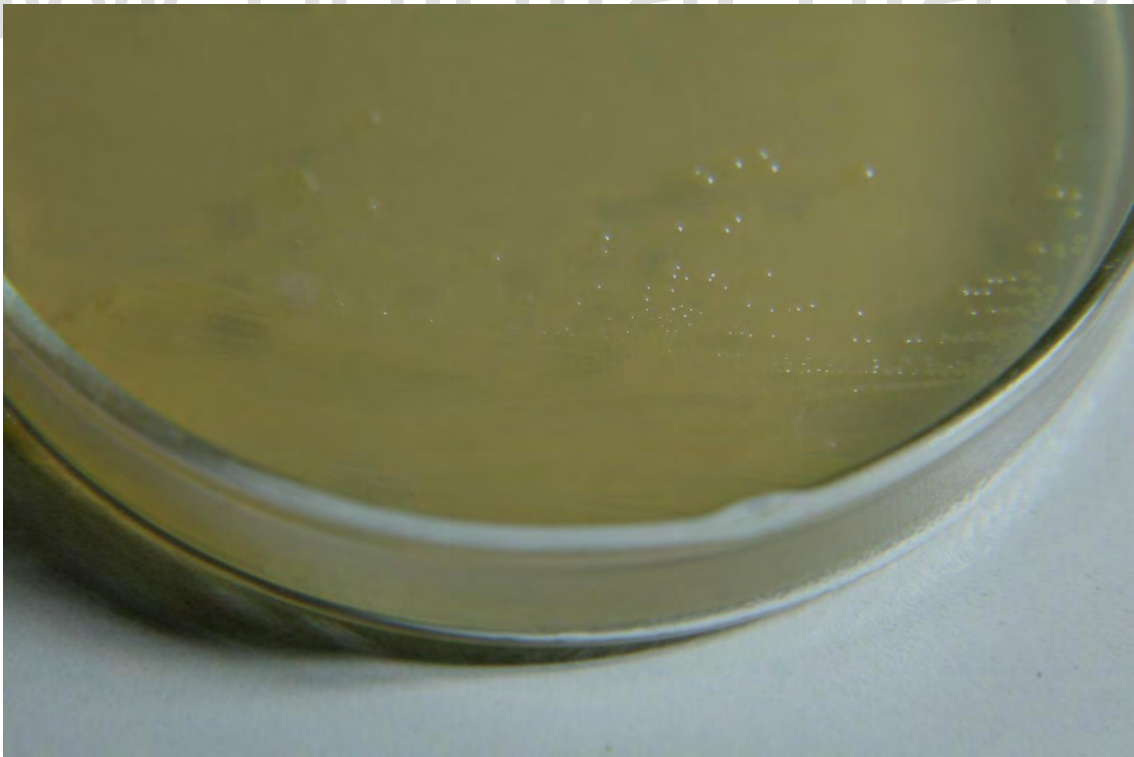
K1= *Arthrobacter sp.*



K2= *Sphingomonas sp.*



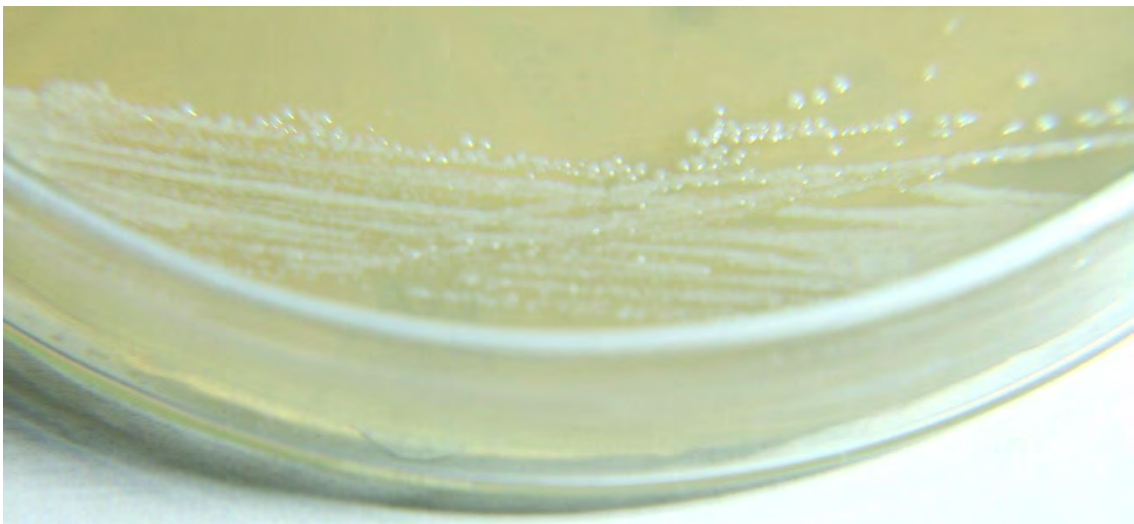
K3-1= *Cryobacterium* sp.



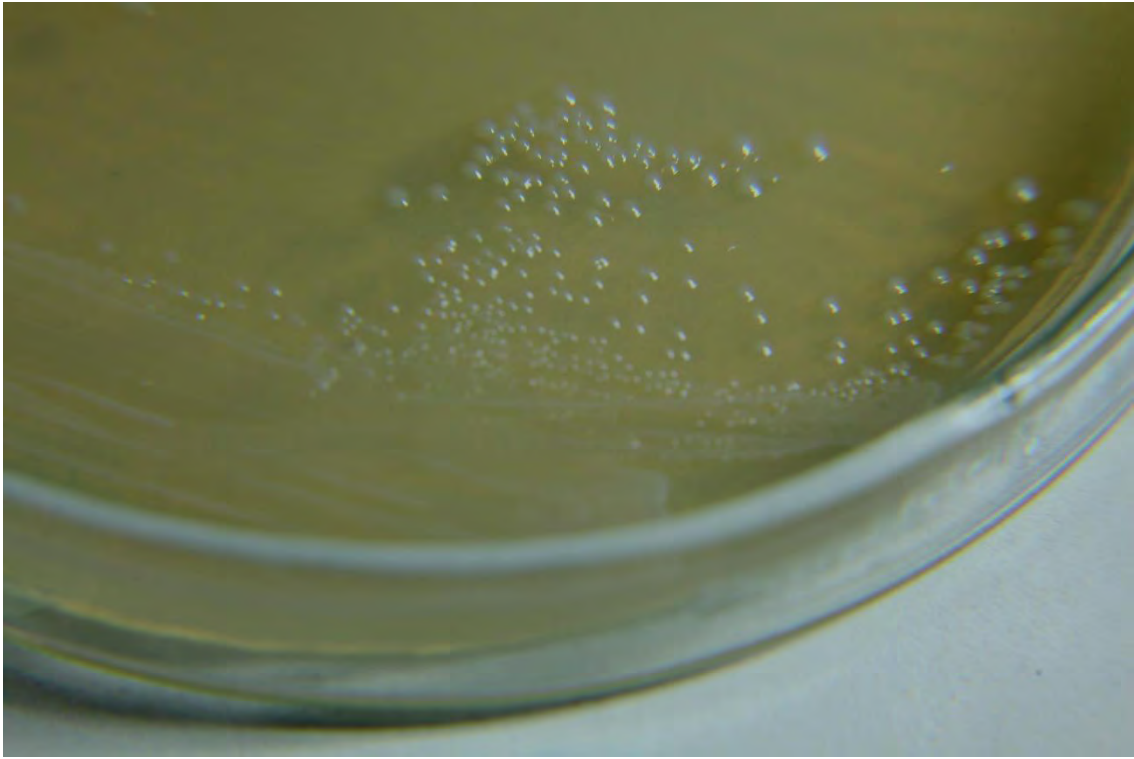
K3-2= *Sphingomonas* sp.



K4= *Arthrobacter* sp.



K6= *Paenarthrobacter* sp.

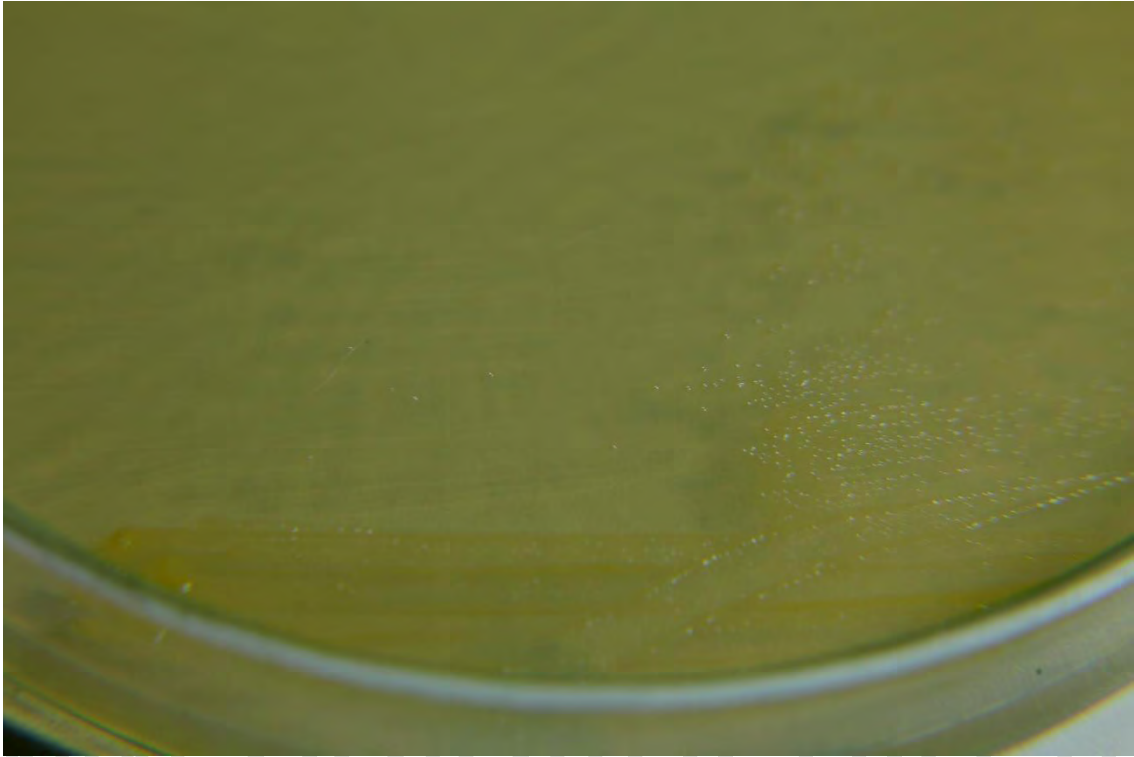


K7-2= *Pseudomonas* sp.

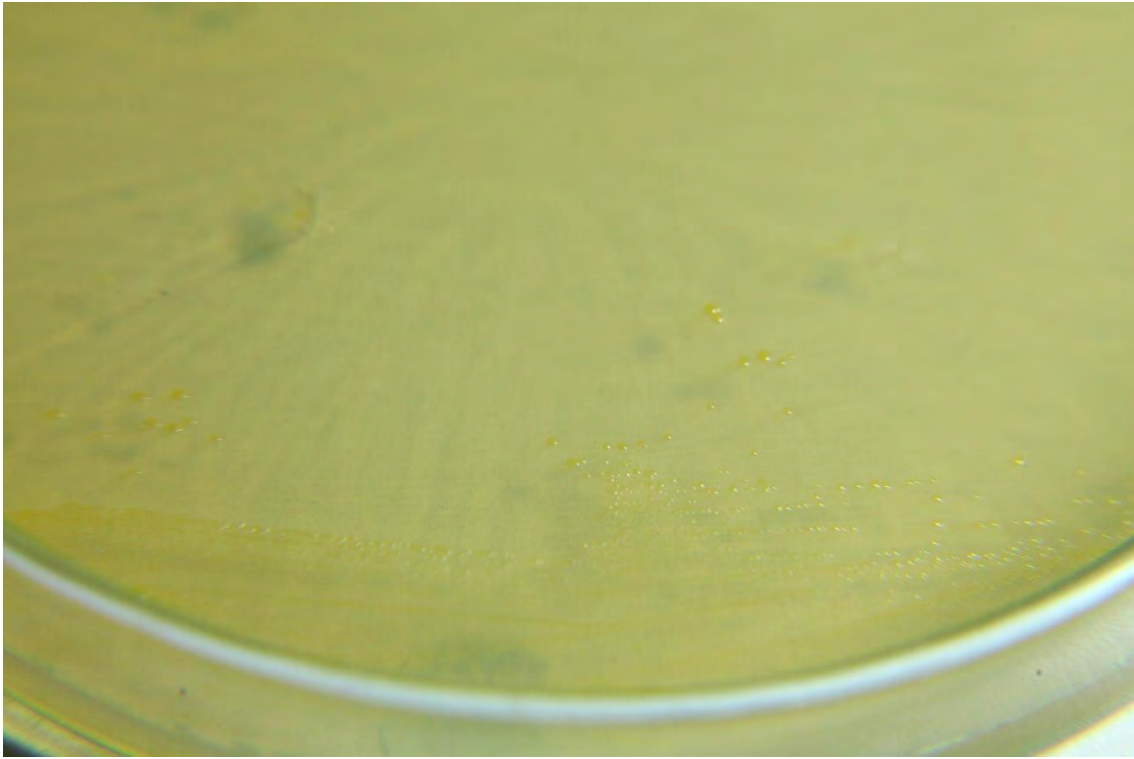
www.bdigital.ula.ve



K10= *Frondihabitans* sp.

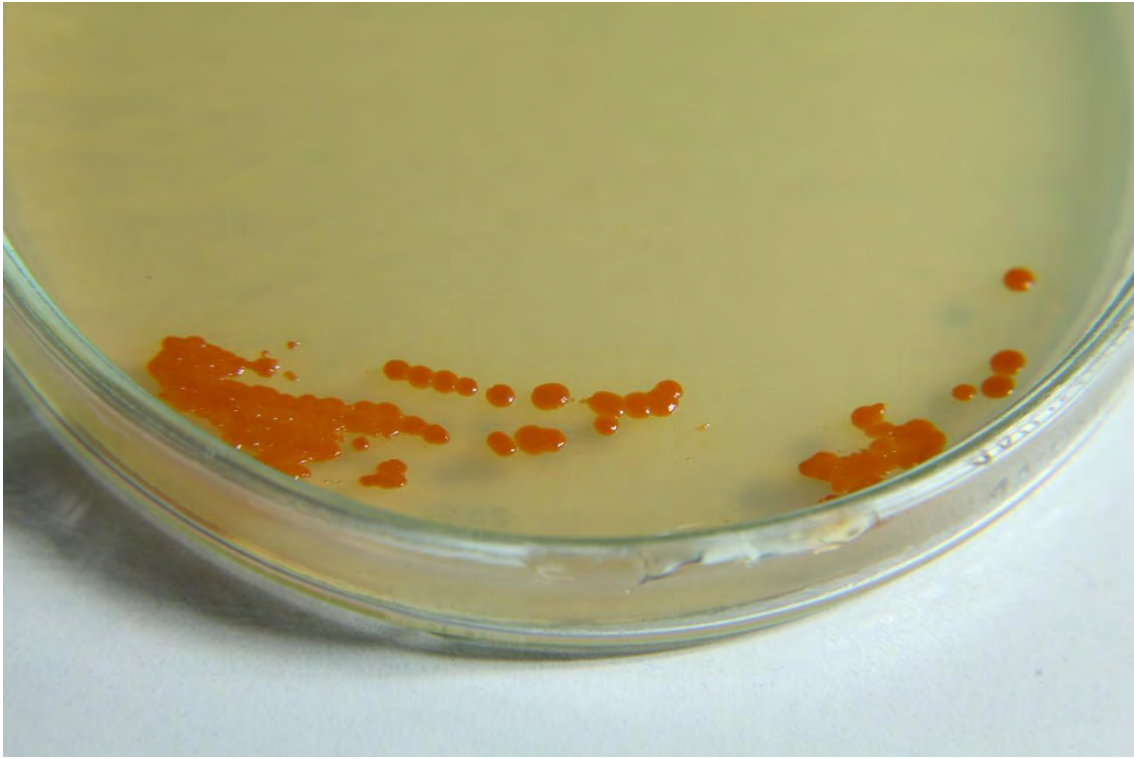


K11= *Cryobacterium* sp.



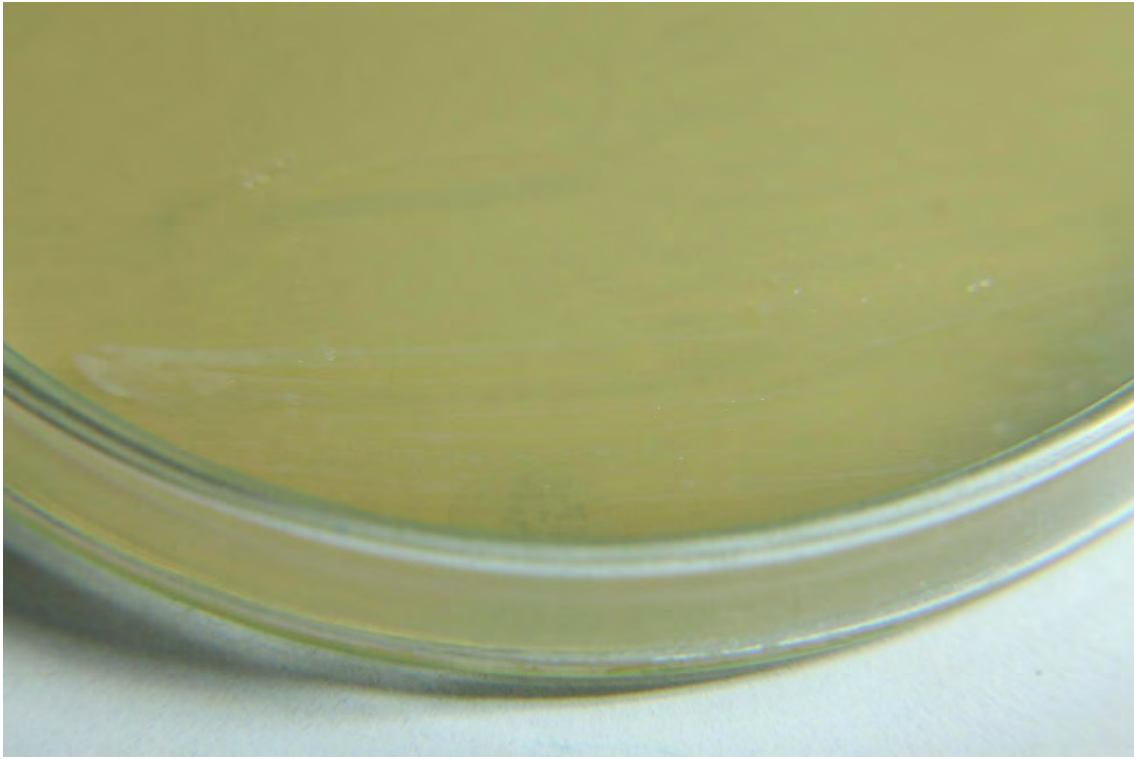
www.bdigital.ula.ve

K12= sin identificar



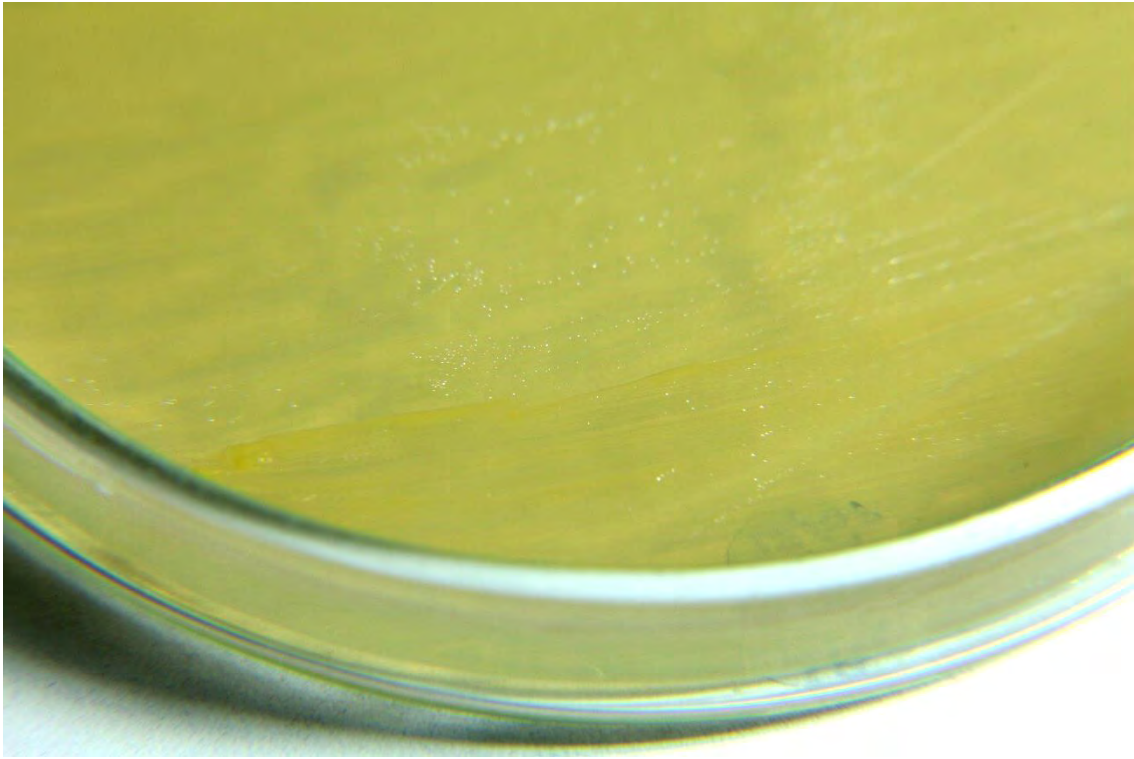
www.bdigital.ula.ve

K13= sin identificar



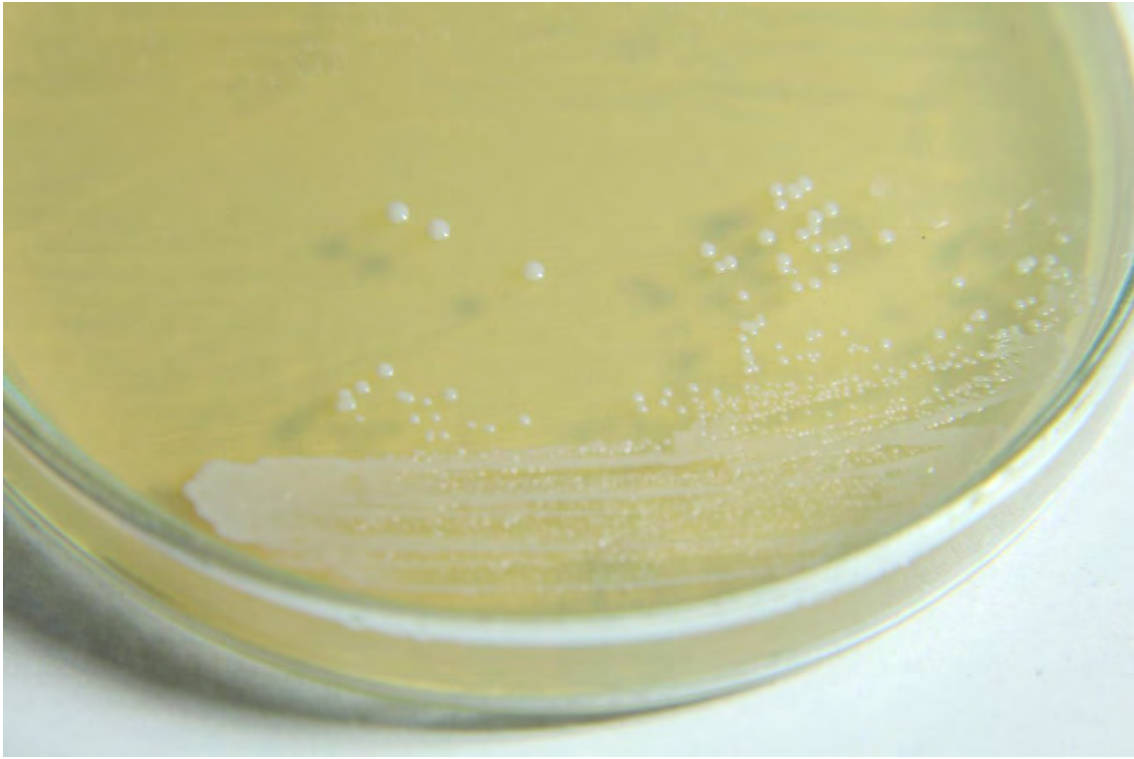
www.bdigital.ula.ve

K14= *Cryobacterium sp.*



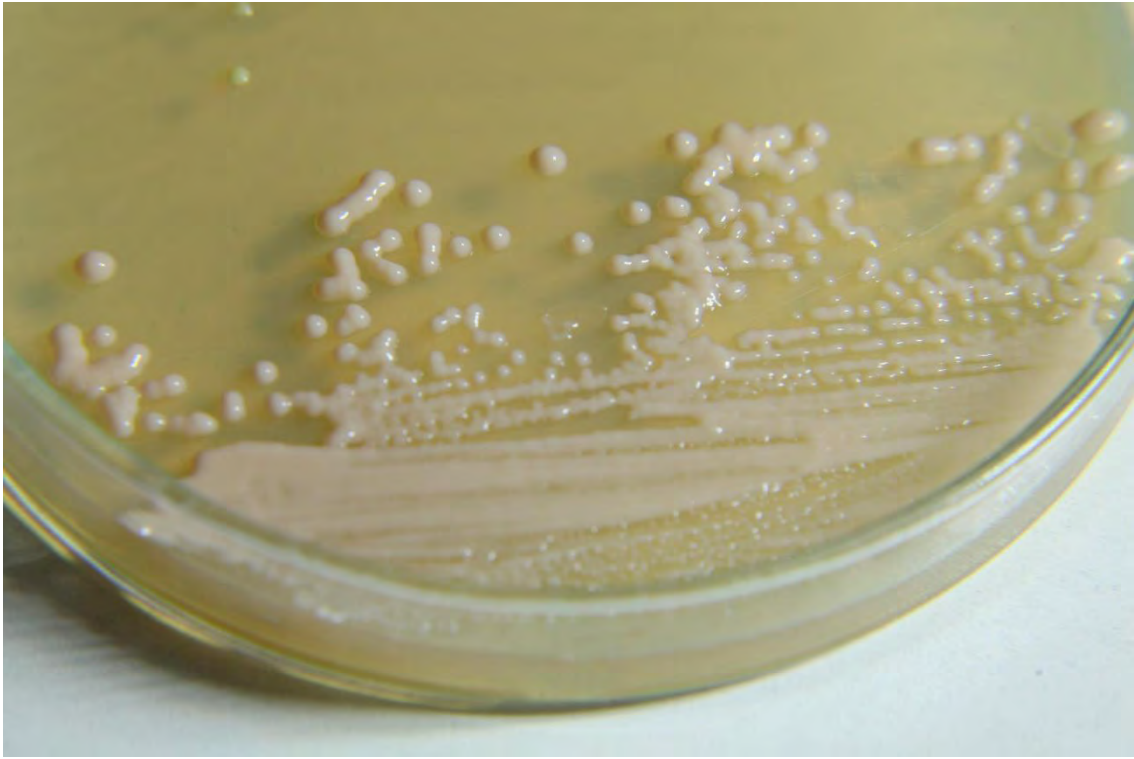
www.bdigital.ula.ve

K15= *Arthrobacter* sp.



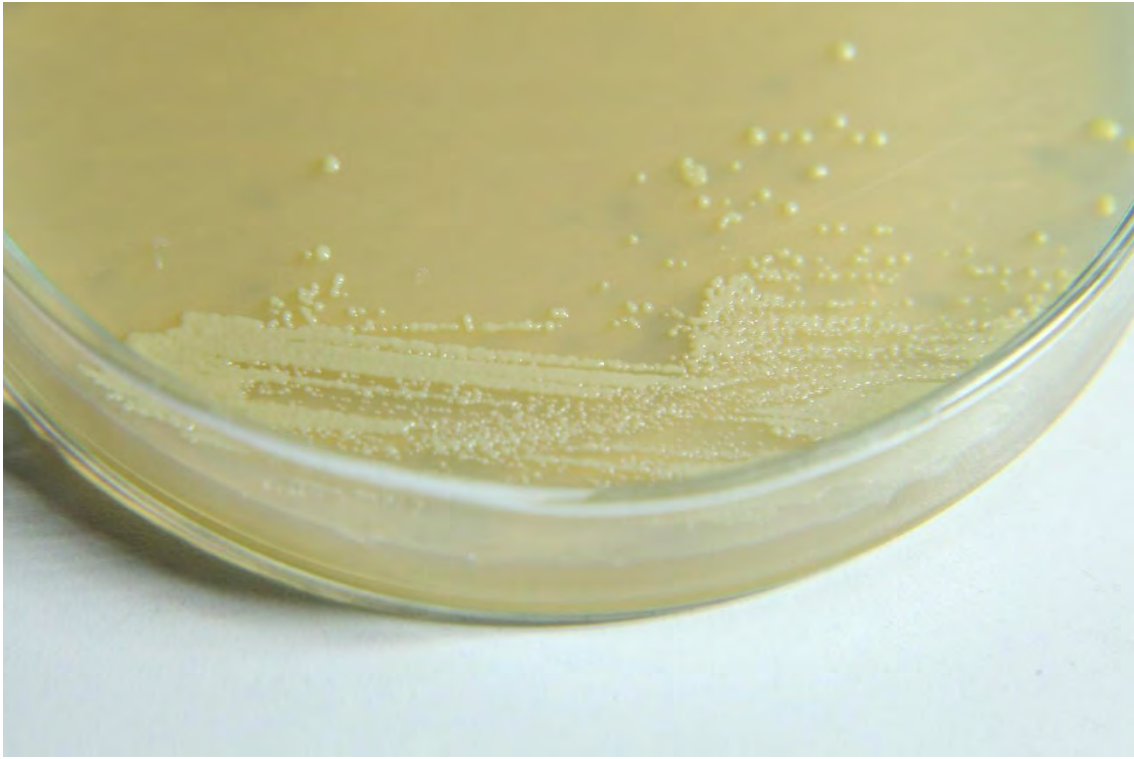
www.bdigital.ula.ve

K16= *Rhodococcus sp.*



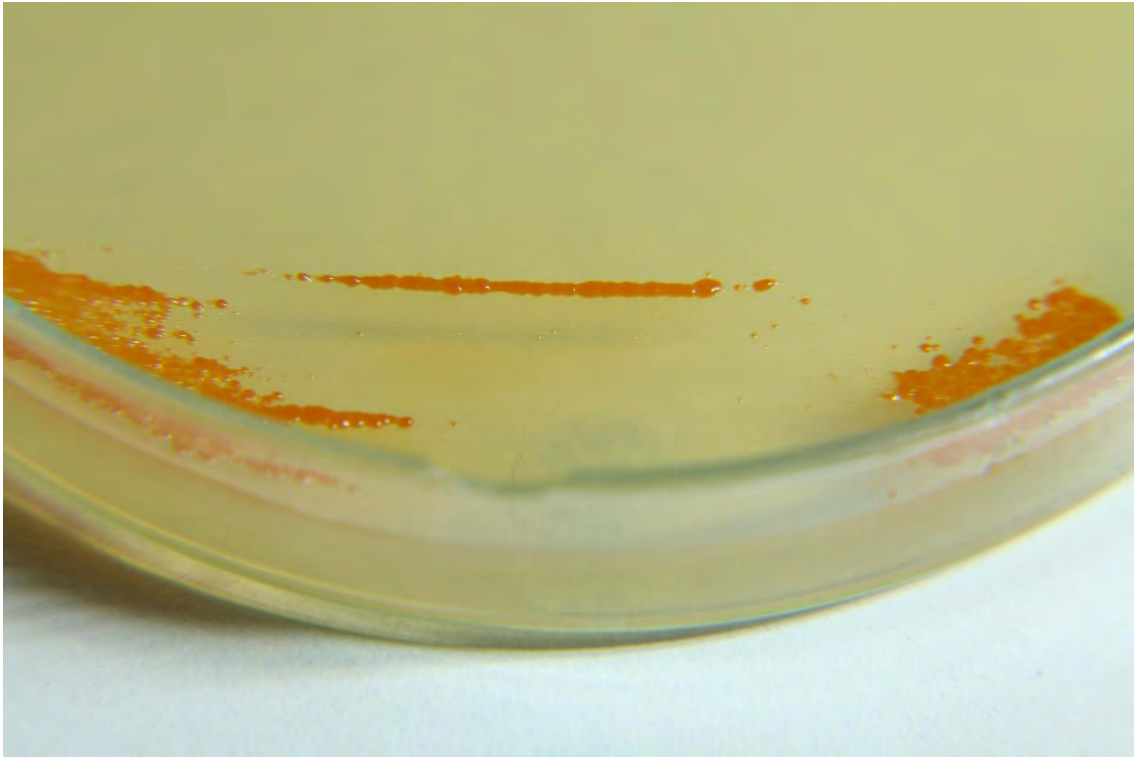
www.bdigital.ula.ve

K17= sin identificar



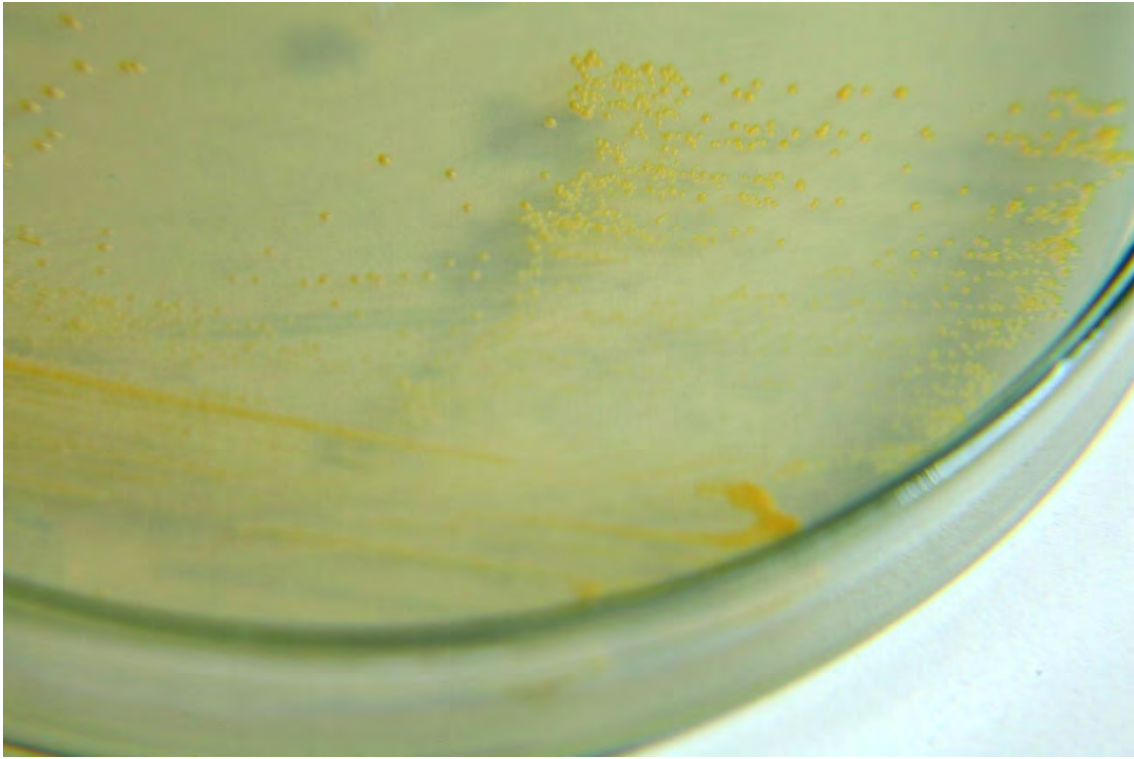
www.bdigital.ula.ve

K18= *Sphingomonas* sp.



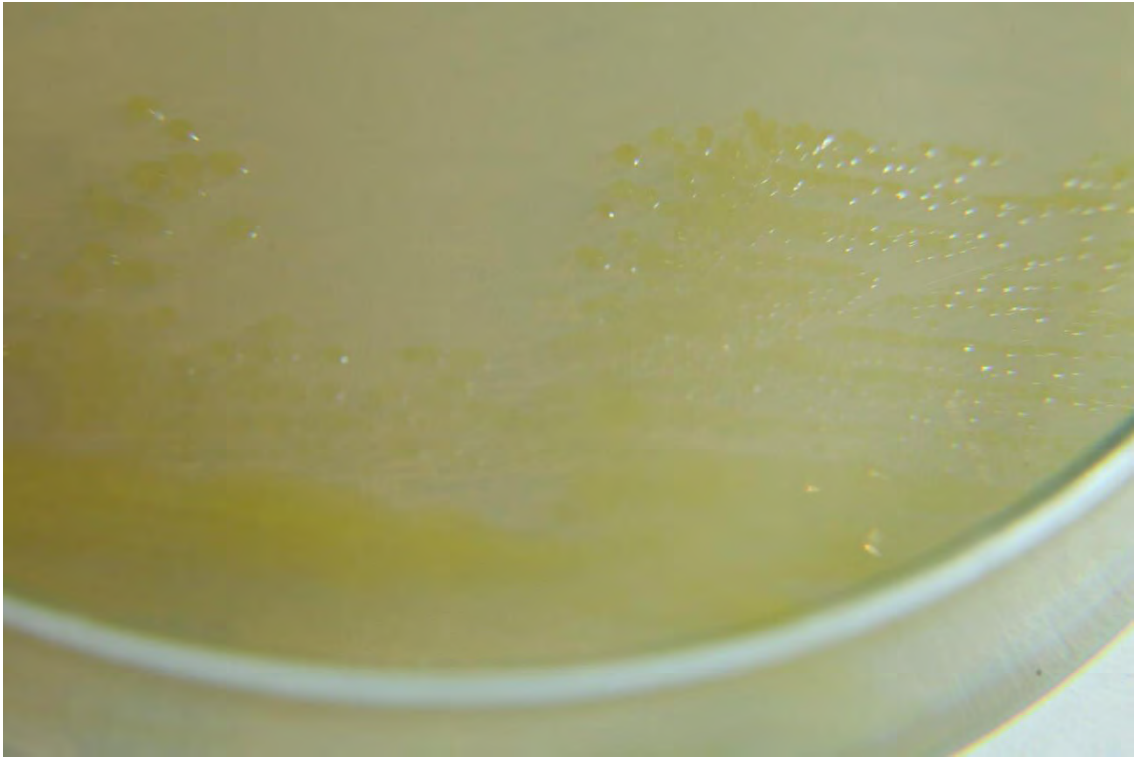
www.bdigital.ula.ve

K19= *Frondihabitans* sp.



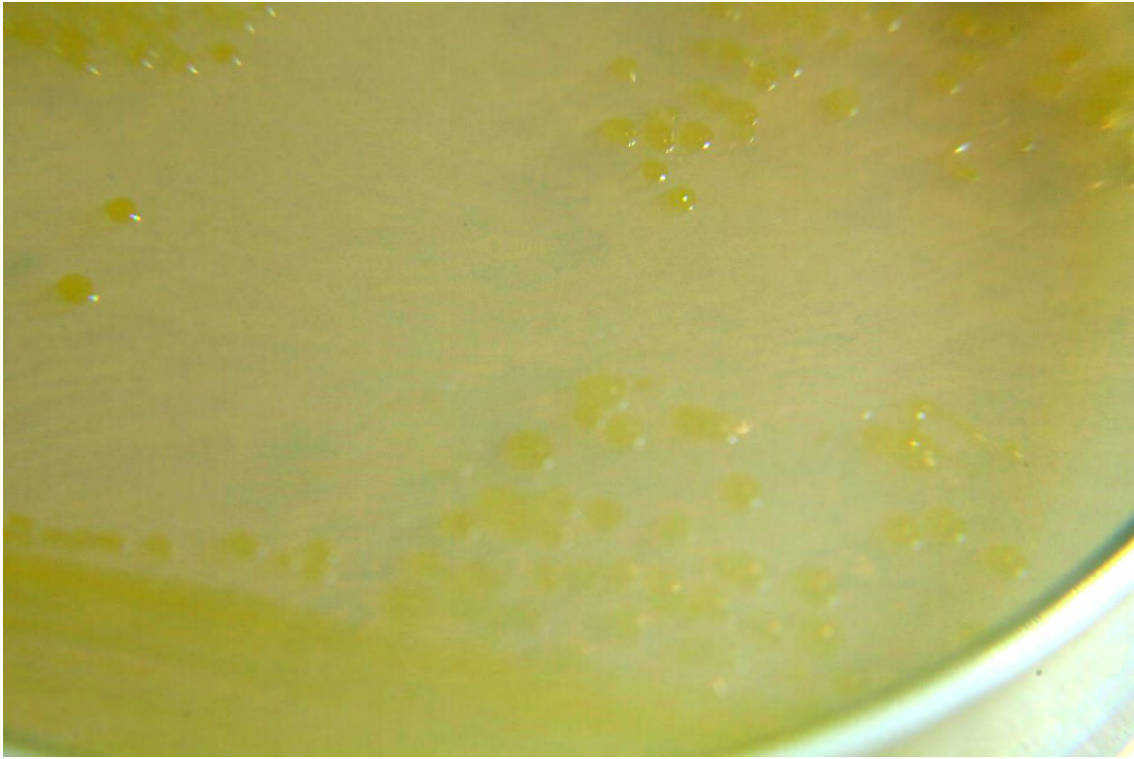
www.bdigital.ula.ve

K20= *Frondihabitans* sp.



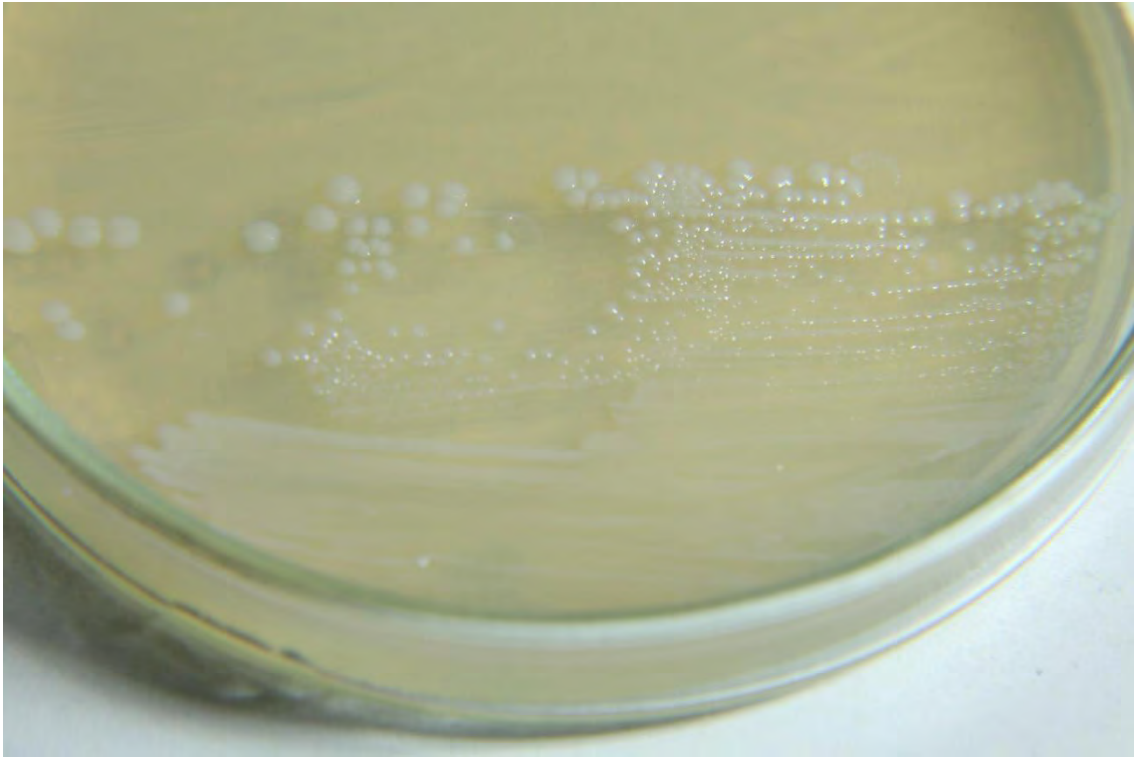
www.bdigital.ula.ve

K21= *Frondihabitans* sp.



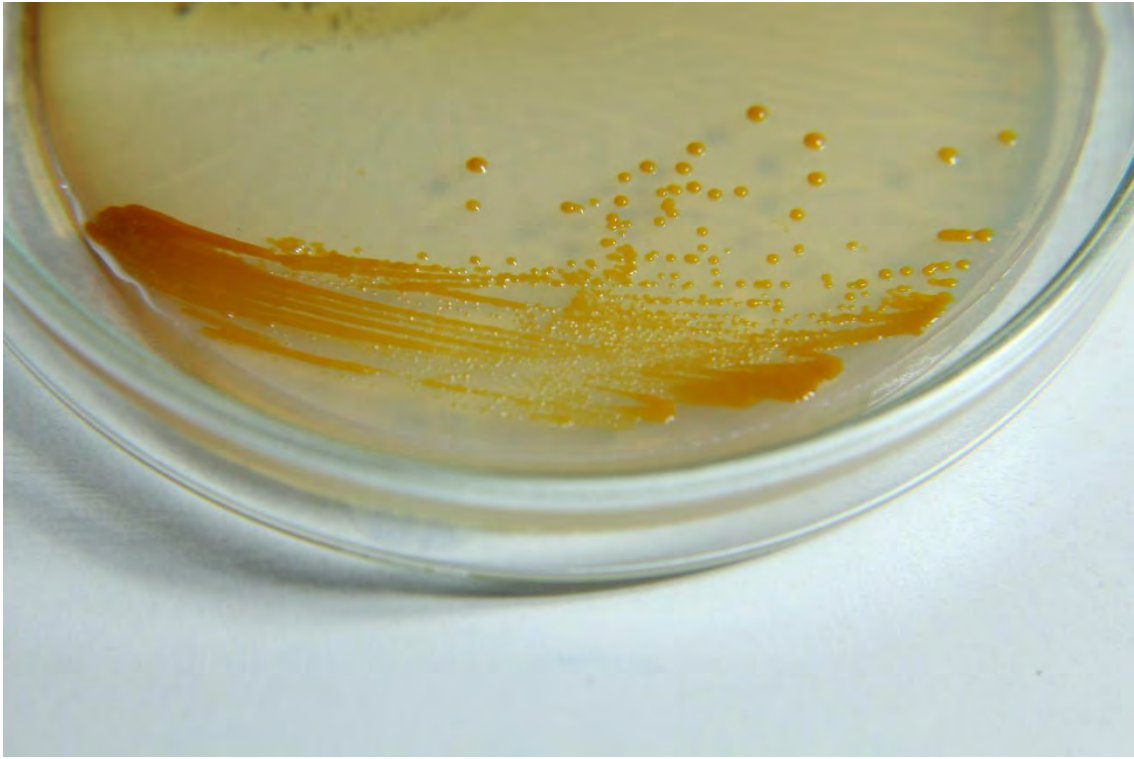
www.bdigital.ula.ve

K23= *Arthrobacter* sp.



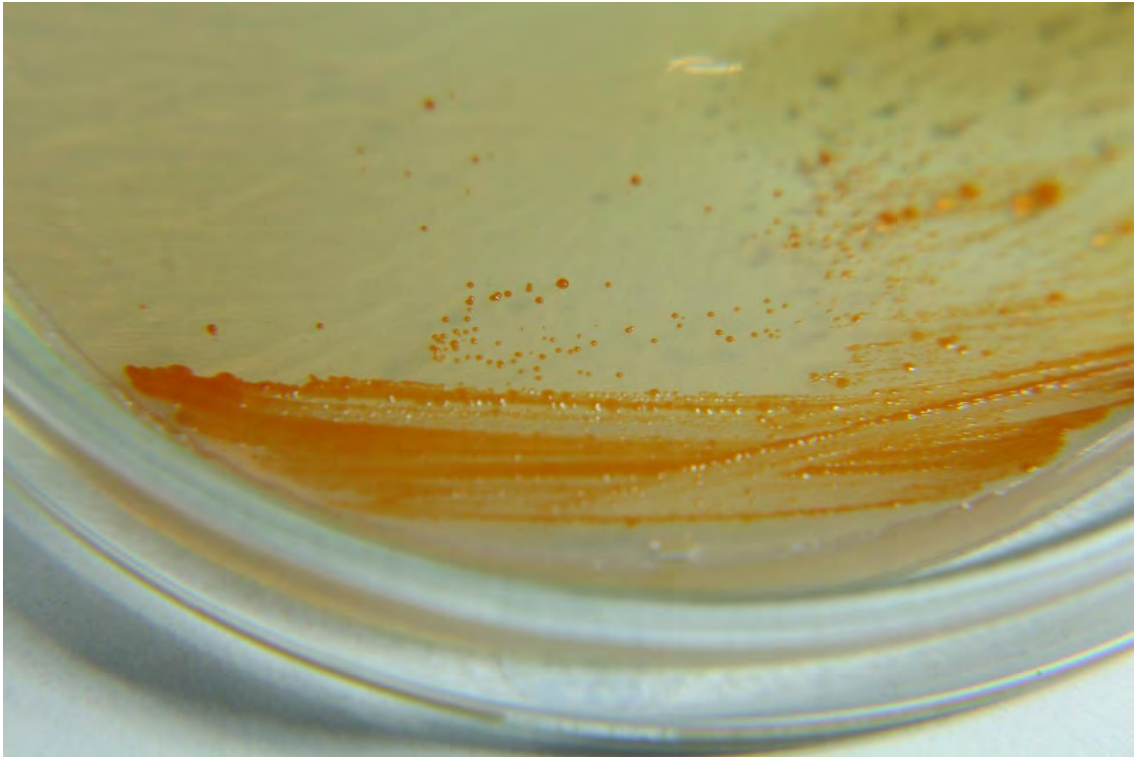
www.bdigital.ula.ve

K24= *Sphingomonas sp.*



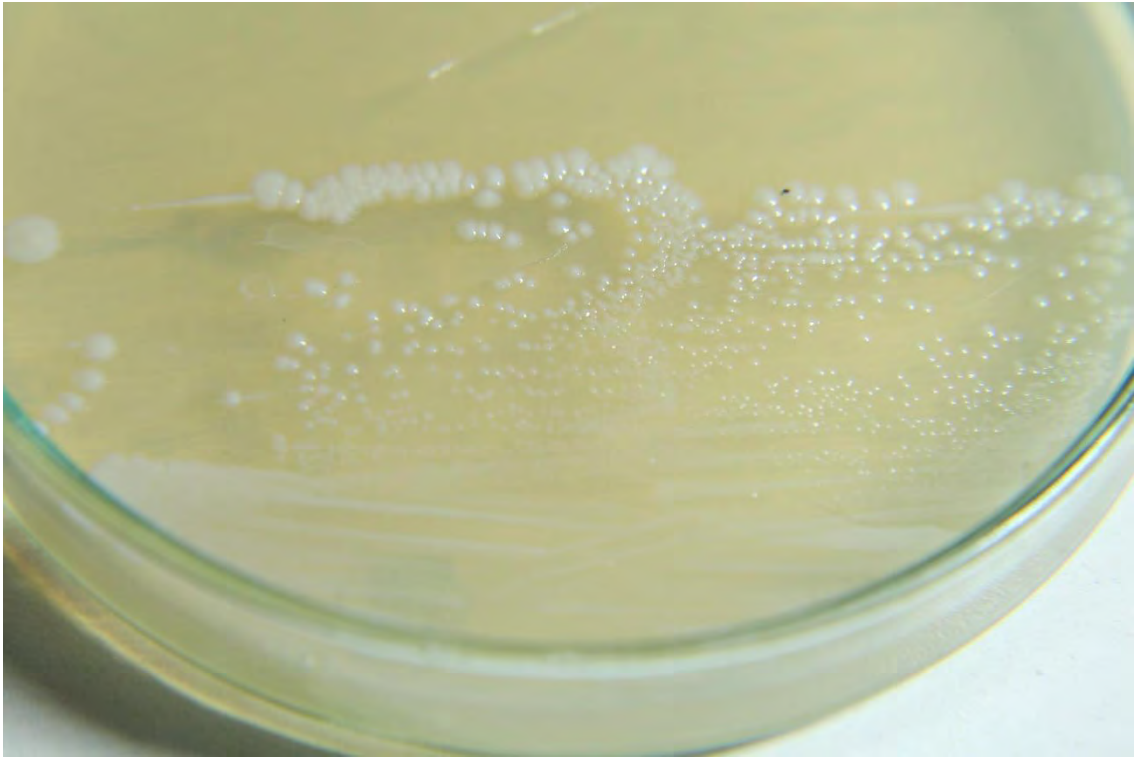
www.bdigital.ula.ve

K25= *Sphingomonas sp.*



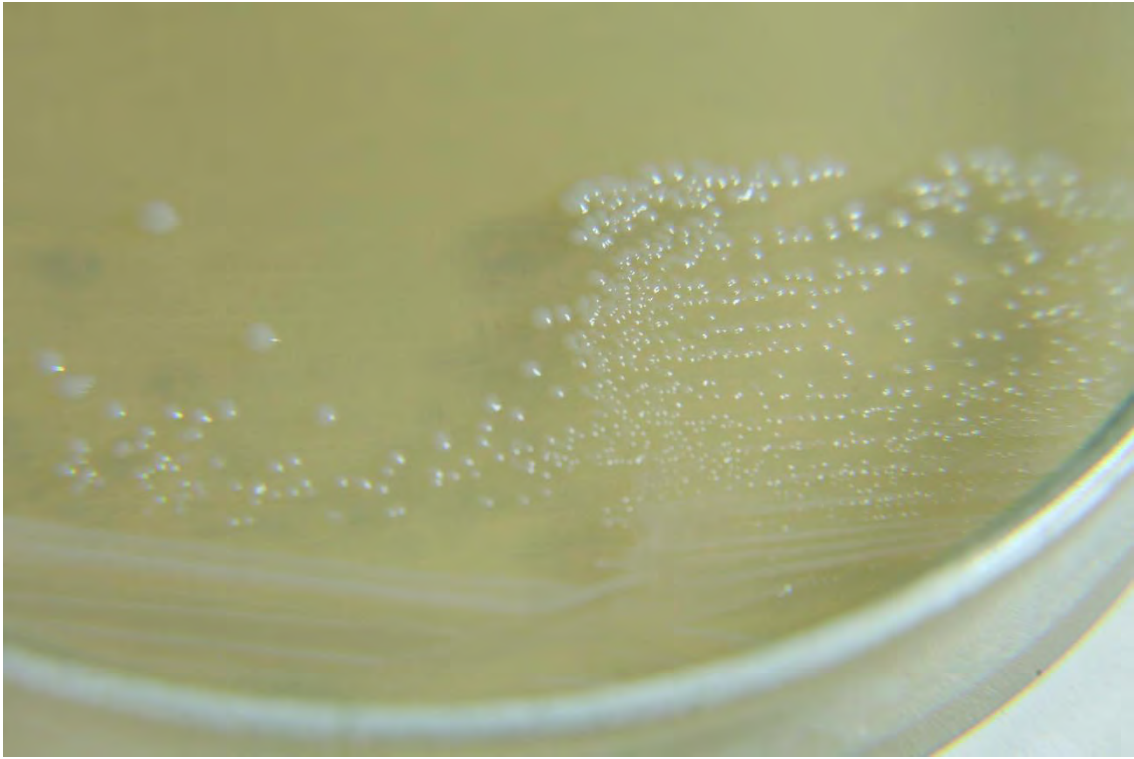
www.bdigital.ula.ve

K27= *Arthrobacter* sp.

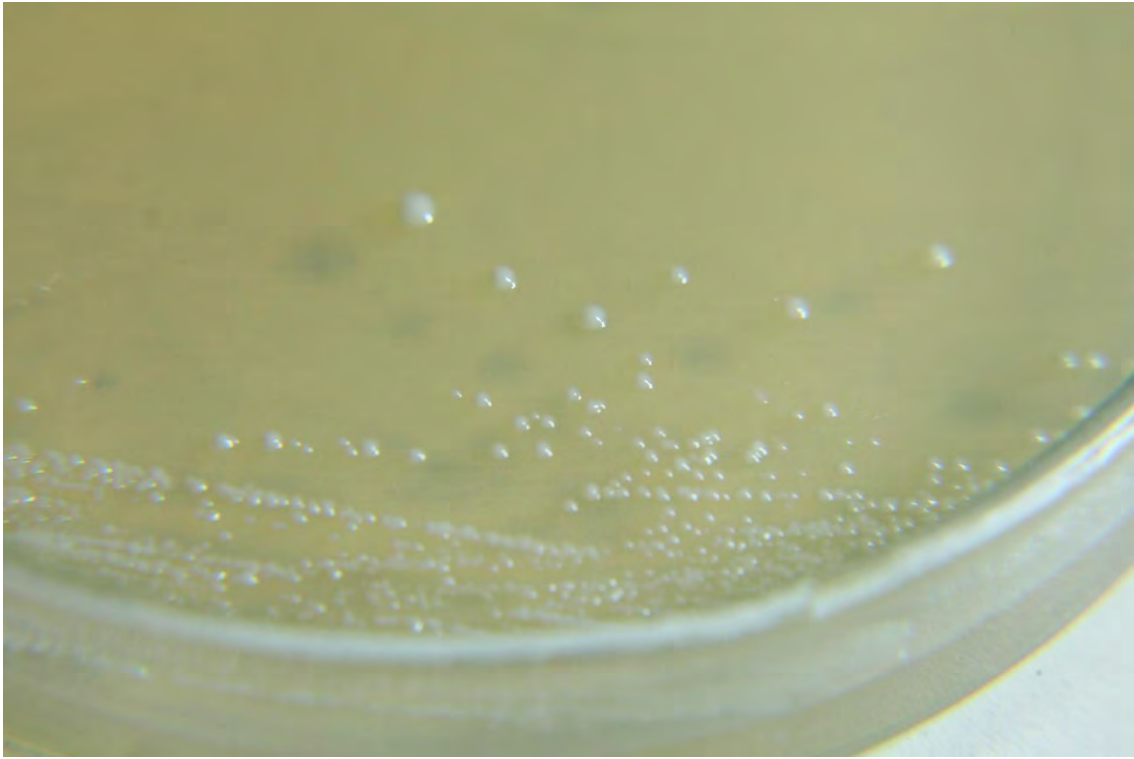


www.bdigital.ula.ve

K28=

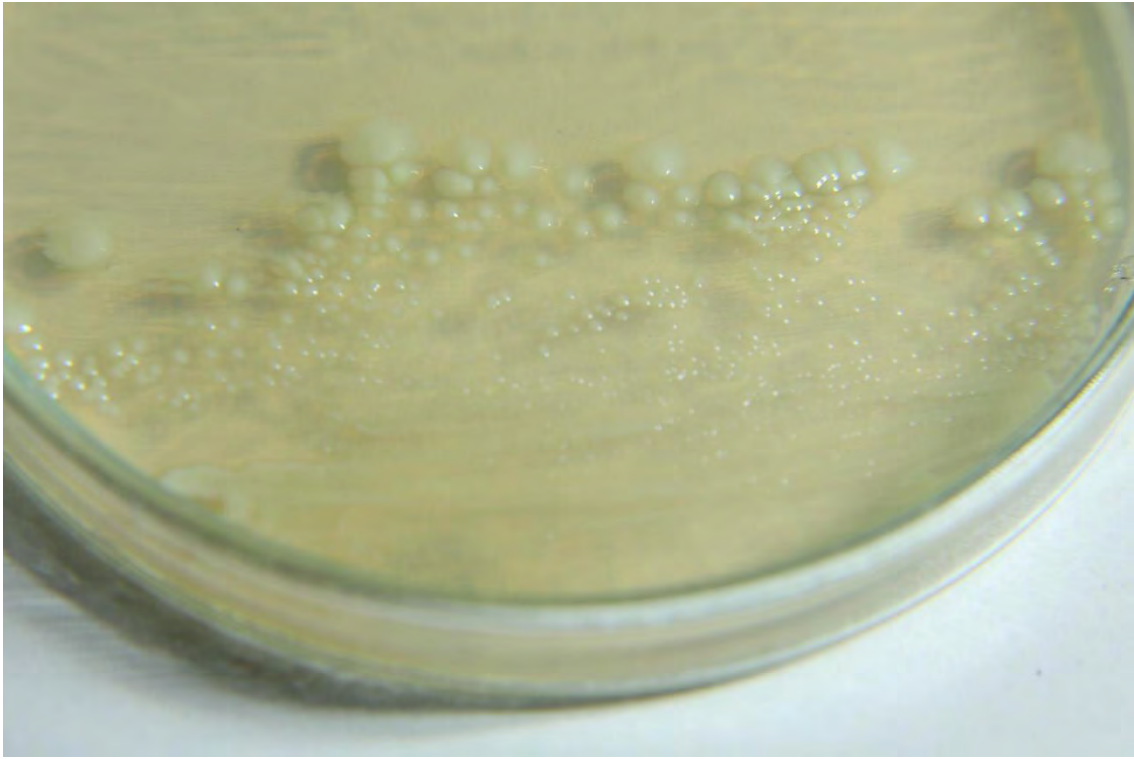


K29 www.bdigital.ula.ve



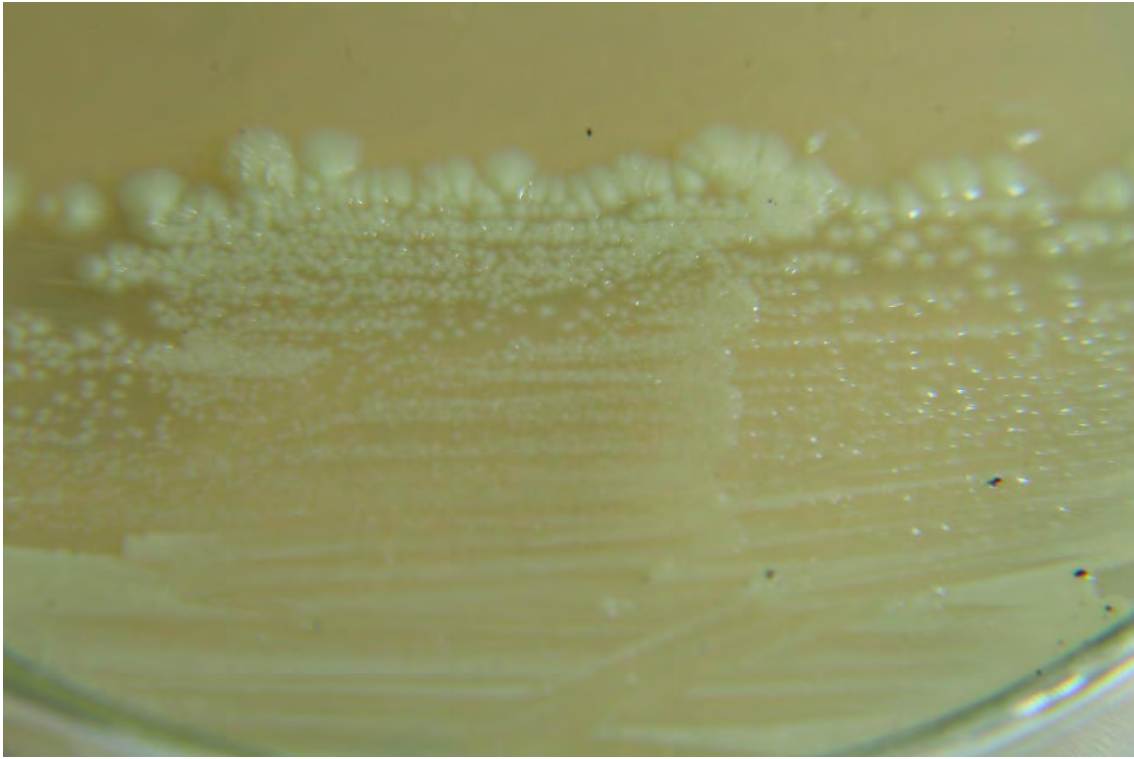
www.bdigital.ula.ve

K31= *Pseudomonas* sp.



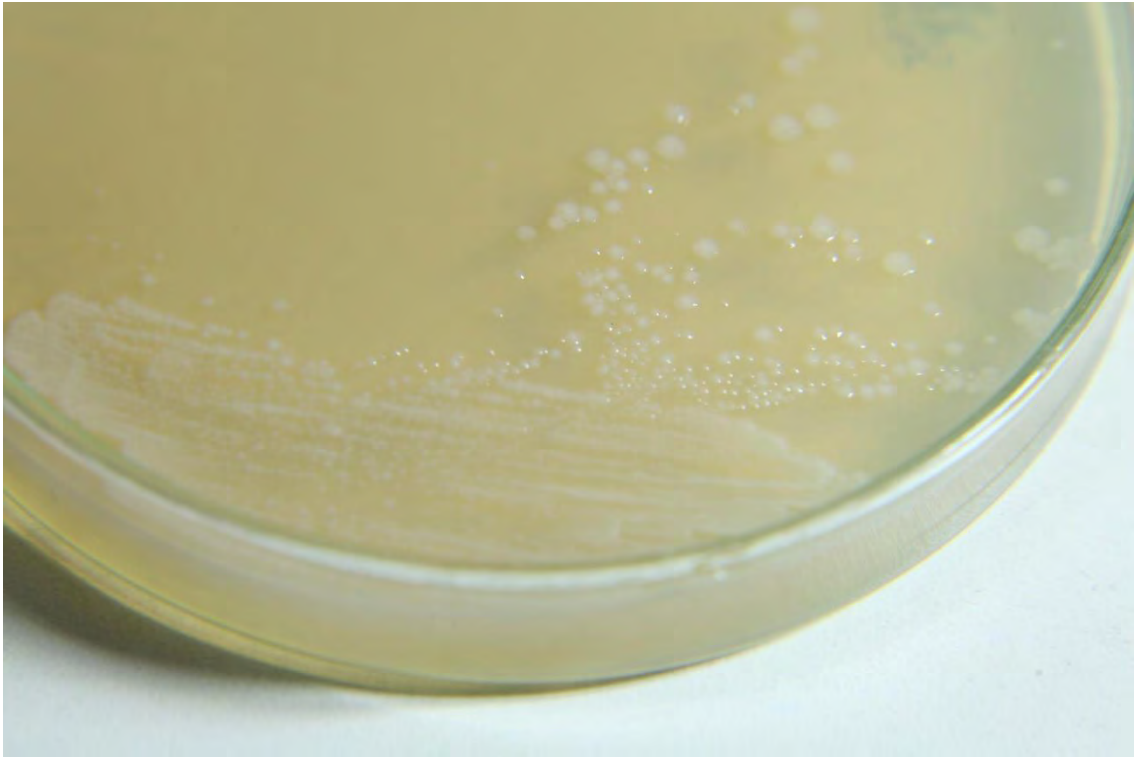
www.bdigital.ula.ve

K32= *Pseudomonas* sp.



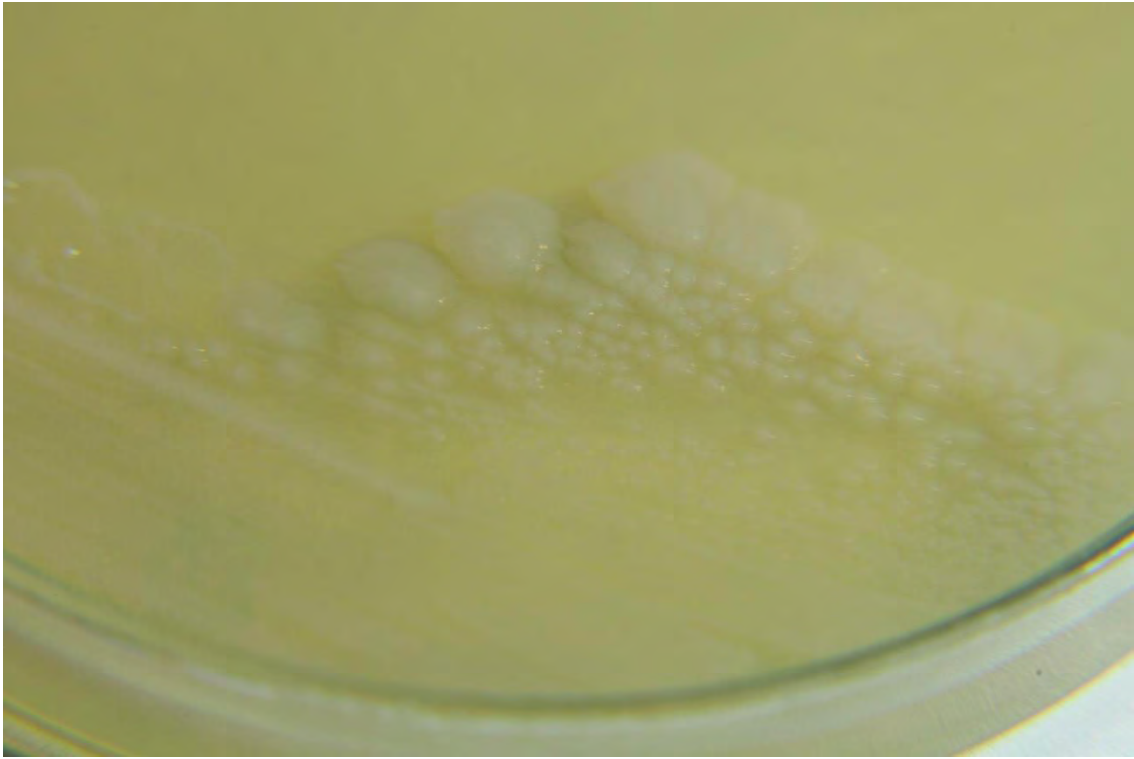
www.bdigital.ula.ve

K34= *Pseudomonas* sp.



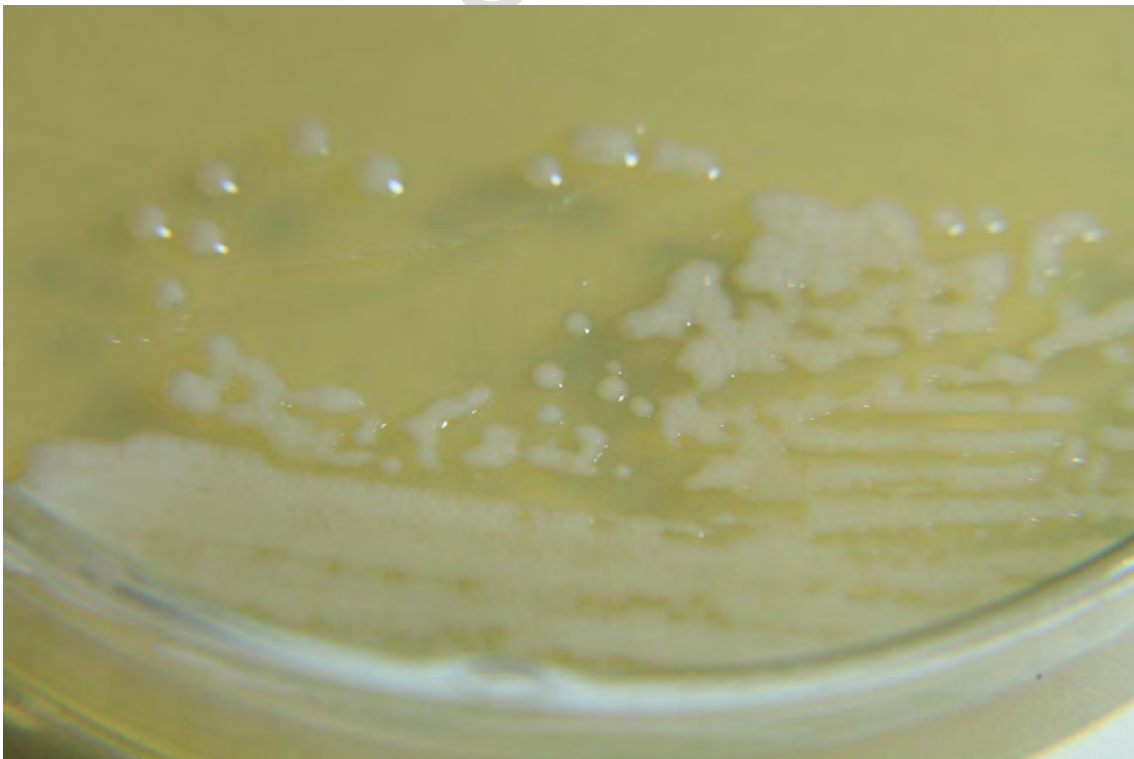
www.bdigital.ula.ve

K35= *Pseudomonas sp.*



www.bdigital.ula.ve

K37= *Pseudomonas* sp.



www.bdigital.ula.ve