

**Estudio de la microbiota rizósferica de *Espeletia* sp. en los páramos de
Santa Inés y Urrao, Antioquia**

Diana Lorena Gómez Vásquez

Trabajo de grado para optar al título de Bióloga

Asesora

Pilar Ximena Lizarazo Medina MSc. DSc

**Universidad de Antioquia
Facultad ciencias exactas y naturales
Instituto de Biología**

2013

TABLA DE CONTENIDO

1. MARCO TEÓRICO	7
1.1 La rizósfera como hábitat microbiano	7
1.2 Microbiota funcional	12
1.2.1 Solubilización del fósforo	12
1.2.2 Fijación de nitrógeno atmosférico	13
1.2.3 Microorganismos celulolíticos	14
1.3 El ecosistema paramuno	14
1.3.1 Sistema de páramos de Antioquia	16
1.3.2 Microbiota en suelo de páramos colombianos	17
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	19
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVOS	20
4.1 General	20
4.2 Específicos	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1 Sitios de estudio	21
5.2 Recolección de las muestras	22
5.3 Caracterización fisicoquímica del suelo	22
5.4 Determinación de la biomasa microbiana de la rizósfera de <i>Espeletia</i> sp.	22
5.5 Determinación de la biomasa de bacterias con potencial para fijar nitrógeno, solubilizar fósforo inorgánico y degradar la celulosa	24
5.6 Evaluación del potencial de los microorganismos para hidrolizar la celulosa y solubilizar fosfatos	25
5.7 Análisis de datos	26
6. RESULTADOS	26
6.1 Caracterización de los sitios de muestreo	26
6.2 Propiedades fisicoquímicas del suelo	28
6.3 Determinación de la biomasa microbiana	29

6.3.1 Efecto de las condiciones climáticas sobre la microbiota del páramo de Santa Inés	30
6.3.2 Efecto de las condiciones climáticas sobre la microbiota del páramo de Urrao	32
6.3.3 Relaciones entre las variables, la temporada y el páramo	33
6.4 Biomasa de los grupos funcionales	34
6.5 Evaluación del potencial metabólico	34
6.5.1 Actividad celulolítica	34
6.5.2 Solubilización de fosfato inorgánico	35
7. DISCUSIÓN	36
8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	40
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características fisicoquímicas de los suelos en los sitios de estudio.

Tabla 2. Índices de riqueza, diversidad y similaridad para los grupos evaluados en cada temporada climática en Santa Inés.

Tabla 3. Índices de riqueza, diversidad y similaridad para los grupos evaluados en cada temporada climática en Urrao.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Valores registrados para la temperatura (T), humedad relativa (H) e intensidad lumínica (IL) a nivel de las hojas (amb) y a nivel del suelo.

Figura 2. Biomasa (UFC/g) para cada grupo microbiano evaluado en los páramos de Santa Inés y Urrao.

Figura 3. Proporción de cada uno de los grupos microbianos para cada sitio de muestreo.

Figura 4. Comparación de la biomasa de cada grupo evaluado entre las temporadas de sequía (azul) y lluvia (verde) en el páramo de Santa Inés.

Figura 5. Comparación de la biomasa de cada grupo evaluado entre las temporadas de sequía (azul) y lluvia (verde) en el páramo de Urrao.

Figura 6. Plano de ordenación obtenido por NMDS.

Figura 7. Proporción de la abundancia relativa de microorganismos fijadores de N, solubilizadores de P y celulolíticos en los páramos de Santa Inés y Urrao.

Figura 8. Distribución de los aislados celulolíticos según el índice de hidrólisis.

Figura 9. Distribución de los aislados solubilizadores de fosfatos según el índice de solubilización.

RESUMEN

Los estudios encaminados a establecer la composición y dinámica de las comunidades microbianas en el suelo de los páramos colombianos son muy pocos y no existen registros para el departamento de Antioquia. En este estudio se determinó la comunidad microbiana cultivable asociada a la rizósfera de *Espeletia* sp. de los páramos de Santa Inés y Urrao y se caracterizó su respuesta en las temporadas de sequía y lluvia. Los resultados mostraron que en la rizósfera de *Espeletia* sp. predominan bacilos Gram negativos seguidos por levaduras, hongos filamentosos, *Pseudomonas*, BAFE y actinobacterias, sin embargo, la distribución de la abundancia relativa de cada grupo estudiado fue diferente entre sitios, así como las características ambientales y propiedades fisicoquímicas. Al comparar las biomasa de los grupos microbianos de cada páramo respecto a la temporada climática no se evidenció una tendencia. El estudio de la microbiota funcional mostró que en ambos sitios se establecen poblaciones con potencial para fijar nitrógeno, solubilizar fosfatos inorgánicos e hidrolizar la celulosa.

Palabras clave: comunidad microbiana, biomasa, suelo rizosférico, páramo.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 La rizósfera como hábitat microbiano

El suelo es una capa de minerales que recubre la litosfera y se forma a partir de las rocas que son sometidas a meteorización como consecuencia de factores físicos, químicos y biológicos que las reducen a un compuesto denominado regolito, que finalmente constituye el suelo. Los suelos soportan el desarrollo de las plantas y proveen hábitats que son colonizados por diversos microorganismos, los cuales interactúan entre sí y con el suelo generando una dinámica de cambios constantes que da lugar a la formación de microambientes que favorecen el establecimiento de ciertos organismos, permitiendo la especiación mediada por el nicho (Atlas y Bartha 1997).

La rizósfera es un ambiente dinámico en donde los microorganismos interactúan con las raíces de las plantas y el suelo, la estructura y diversidad de las comunidades microbianas en este microambiente están influenciadas por aspectos biológicos, fisicoquímicos y climáticos que interactúan entre sí seleccionando las poblaciones microbianas dando lugar a la formación de nichos (Faoro et al. 2010).

Las relaciones microorganismo-planta son ubicuas a lo largo de los diferentes niveles tróficos y son un componente esencial de la función del ecosistema. Estas relaciones están clasificadas basándose en el efecto sobre las plantas de forma que pueden ser: negativas (fitopatógenos), positivas (promotores de crecimiento, simbioses) o neutrales (Nannipieri et al. 2008). Esta relación puede ser directa de modo que los compuestos liberados ya sea por la planta o por el microorganismo son aprovechados por el otro o indirecta por la modificación del medio a nivel físico o químico (Atlas y Bartha 1997).

Dentro de las interacciones directas puede destacarse el efecto que tienen las sustancias introducidas al suelo por rizodeposición, tales como los exudados radiculares, carbohidratos, proteínas y lisados celulares, que actúan seleccionando y/o promoviendo el crecimiento de algunas poblaciones microbianas específicas que los metabolizan

(Nannipieri et al. 2008). Myung et al. (2012) analizaron suelo del rizoplaneo y suelo distante de la rizósfera en bosques tropicales y encontraron que la biomasa del género *Burkholderia* fue 40 veces mayor en el rizoplaneo, lo que fue explicado como el posible efecto del aprovechamiento de las fuentes de carbono secretadas por las raíces. La acción que tienen los exudados radiculares sobre el ensamblaje de la comunidad microbiana también puede ser indirecta ya que modifican algunas propiedades fisicoquímicas del suelo como el pH y el contenido de algunos elementos (Nannipieri et al. 2008). Por ejemplo, en el caso de la reducción del manganeso, el ácido ascórbico en conjunto con otros exudados radiculares de las plantas de trigo disuelve el óxido de manganeso en la rizósfera para que pueda ser aprovechado por la planta (Uren 2007).

Este intercambio de compuestos, especialmente la secreción de exudados radiculares, lleva a una actividad enzimática mayor en el suelo rizosférico que en el alejado de la rizósfera dándose lugar a procesos como la fijación del nitrógeno, la solubilización del fósforo y la degradación de compuestos carbonados entre otros que favorecen el crecimiento vegetal (Nannipieri et al. 2008). Además, las relaciones positivas entre las rizobacterias y las plantas incluyen la producción de fitohormonas, la inhibición de la síntesis de etileno, el aumento en la permeabilidad de la raíz, el incremento de la tolerancia a factores abióticos causantes de estrés y la protección frente a fitopatógenos (Kim Won-Il et al. 2011).

A pesar de la alta diversidad taxonómica de los microorganismos, sólo unos pocos grupos de bacterias se han encontrado asociados a la mayoría de las especies de plantas, en particular los miembros del *phylum* Proteobacteria (Pini et al. 2012). La hipótesis más aceptada es que la capacidad de colonizar una planta no es una característica generalizada en la comunidad bacteriana del suelo sino que reside preferentemente en taxones específicos con diversas funciones enzimáticas o con el potencial genético para asociarse con plantas. Este planteamiento ha sido apoyado por el hallazgo de un conjunto de genes común en todos los miembros de las Proteobacterias que establecen relaciones con plantas (Sorensen y Sessitsch 2007 y Pini et al. 2011), además, la composición de la

comunidad bacteriana en el suelo rizosférico de *Rumex patientia* muestra la dominancia del *phylum* Proteobacteria, mientras en el suelo no rizosférico predominan Bacteroidetes y Acidobacterias (Qi et al. 2012).

Respecto al efecto de las características fisicoquímicas se ha propuesto que el pH es la variable que mejor predice la estructura de la comunidad microbiana. Fierer y Jackson (2006) analizaron la diversidad de la comunidad bacteriana en suelos de diferentes ecosistemas a lo largo del continente americano reportando que los estimativos de riqueza disminuyen conforme los valores de pH se alejan de la neutralidad hacia la acidez. Posteriormente, se demostró que la abundancia del *phylum* Acidobacteria está estrechamente relacionada de manera negativa con el valor de pH (Jones et al. 2009).

El contenido de fósforo en el suelo, independientemente de ser o no rizosférico, tiene un efecto sobre la incidencia de las poblaciones bacterianas fosfato solubilizadoras ya que estas aumentan conforme disminuye del contenido de fósforo (Mander et al. 2012). El nitrógeno también influye en la dinámica de las poblaciones, Fierer et al. 2012 reportaron que poblaciones de Actinobacterias, Bacteroidetes y Proteobacterias (alfa y gama) aumentan su abundancia relativa tras la adición de fertilizantes nitrogenados, mientras las Acidobacterias tienden a disminuir.

En cuanto a elementos menores presentes en el suelo, Faoro et al. (2010) reportaron que el incremento de Al^{3+} está vinculado a la disminución de la diversidad, mientras la relación Ca^{2+}/Mg^{2+} se relaciona directamente con la diversidad. La textura del suelo también ejerce una influencia sobre las comunidades microbianas, de modo que la fracción arcillosa presenta una mayor biomasa y diversidad comparada con las fracciones de limo y arena (Sessitsch et al. 2001).

En relación a las condiciones atmosféricas, los periodos secos y lluviosos afectan la disponibilidad de agua y oxígeno y por lo tanto el ensamble microbiano. En suelos encharcados el oxígeno presente se encuentra disuelto en el agua y es consumido

rápidamente por los microorganismos generándose condiciones anóxicas (Madigan et al. 2010). Un estudio realizado con el fin de comparar la respuesta de la comunidad microbiana ante la continua entrada de agua demostró, al analizar los marcadores de los ácidos grasos metil ésteres de cada grupo, que el estancamiento reduce el porcentaje de bacterias aerobias, Gram positivas, Gram negativas y hongos micorrízicos en comparación con los suelos donde se permite el flujo de agua (Unger et al. 2009).

En general, los *phyla* bacterianos dominantes en el suelo de diferentes ecosistemas son Acidobacteria, Actinobacteria y Proteobacterias (Chu et al. 2010 y Faoro et al. 2010). Acidobacteria es el *phylum* bacteriano más abundante en los suelos a nivel global, habitan en una amplia variedad de entornos naturales en un intervalo de temperatura, salinidad y materia orgánica, su abundancia se correlaciona con el pH, su rol ecológico y funcional ha sido poco caracterizado debido a su reciente descubrimiento y la dificultad para su cultivo en condiciones de laboratorio, sin embargo, se ha comprobado que degradan algunos polisacáridos (Rawat et al. 2012)

El *phylum* Actinobacteria es un grupo de bacterias Gram positivas con altos contenidos de guanina y citosina, presentan un crecimiento micelial y la mayoría de sus miembros son aerobios; en suelos ácidos se ha reportado una incidencia mayor de géneros como *Acidimicrobium*, *Streptomyces* y *Actinospica*, su estudio tiene relevancia ya que desempeñan un papel importante en el recambio de la materia orgánica, en el ciclo del carbono y en la inhibición de algunos patógenos debido a la producción de antibióticos (Jenkins et al. 2010).

Dentro de Proteobacterias se encuentra el género *Pseudomonas* el cual es muy diverso y está conformado por bacilos Gram negativos, estrictamente aerobios, flagelados, oxidasa positivos (Madigan et al. 2010). Este género ha sido ampliamente estudiado debido a su versatilidad metabólica, algunas especies producen antibióticos y sideróforos actuando como agentes biocontroladores de hongos y nemátodos, son promotoras de crecimiento vegetal ya que pueden fijar nitrógeno atmosférico y solubilizar fósforo inorgánico,

además son utilizadas en biorremediación debido al potencial para degradar hidrocarburos (Das y Mukherjee 2007 y Noory y Saud 2012).

Aunque la incidencia del género *Bacillus* no es tan marcada en suelos, su estudio ha cobrado gran interés debido a que algunas especies pueden ser utilizadas como promotoras de crecimiento vegetal, en especial los miembros de Bacterias Aerobias Formadoras de Endospora (BAFE), las cuales son ampliamente utilizadas en campo debido a su ventaja para resistir condiciones extremas como la radiación, el calor, la sequía y sustancias tóxicas mediante la formación de la endospora (Madigan et al. 2010). Por ejemplo, *B. amyloliquefaciens* presenta actividad fitasa extracelular que contribuye al desarrollo de las plántulas de maíz (Idriss et al. 2002). Algunas especies generan protección sistémica a enfermedades como en el caso de cultivos de remolacha (*Beta vulgaris*) que al ser tratados con suspensiones de *B. mycooides* son menos susceptibles al ataque de *Cercospora* (Kloepper et al. 2004).

Los hongos filamentosos constituyen una parte importante de la biomasa del suelo. Se ha reportado que estos afectan la estructura del suelo mediante la exudación de polisacáridos y mucilagos lo que ha sido vinculado con la adhesión entre partículas del suelo, además la producción de compuestos hidrofóbicos afectan las tasas de infiltración del agua (Ritz y Young 2004). Se ha demostrado que los hongos cumplen funciones como la protección frente a fitopatógenos, participan activamente en el reciclaje de nutrientes mediante la descomposición de polímeros como celulosa, hemicelulosa y lignina contribuyendo con el mantenimiento del ciclo del carbono (Atlas y Bartha 1997).

En el caso de las levaduras son pocos los estudios realizados aunque se sabe que su mayor reservorio es el suelo donde predominan géneros como *Schwanniomyces* y *Lipomyces* (Déak y Beuchat 1996). Sin embargo, estudios como el realizado por Yurkov et al. (2012) muestran que la riqueza de especies de levaduras es relativamente baja y es una comunidad dinámica que responde al tipo de vegetación y al uso del suelo. Su importancia ecológica es sobresaliente ya que estos microorganismos han sido

vinculados con el reciclaje y transformación de nutrientes, la promoción del crecimiento vegetal y mantenimiento de la estructura del suelo (Botha 2010).

1.2 Microbiota funcional

1.2.1 Solubilización del fósforo

Los suelos por lo general contienen grandes cantidades de fósforo total que oscilan entre 200 y 5000 mg/kg, sin embargo solo una fracción está disponible para ser asimilada por las plantas, ya que únicamente pueden absorberlo como ortofosfatos (HPO_4^{-2} y $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$) de la solución del suelo, estas formas del fósforo por lo regular presentan concentraciones muy bajas debido a la alta reactividad de estos iones con Fe^{+3} , Al^{+3} y Ca^{+2} (Khan et al. 2009).

Los microorganismos del suelo disponibilizan el fósforo inorgánico mediante la producción de ácidos orgánicos los cuales pueden solubilizar fosfatos al quelar iones Fe^{+3} , Al^{+3} y Ca^{+2} , por ejemplo *Erwinia herbicola* produce ácido glucónico el cual le confiere la habilidad de solubilizar hidroxiapatita. En otros casos el mecanismo principal es la liberación de protones producto de la respiración o durante la asimilación del NH_4^+ . Además, los microorganismos participan en la mineralización del fósforo orgánico a través de la secreción de enzimas hidrolíticas como las fosfatasas ácidas y las fitasas, estas enzimas han sido detectadas en microorganismos como *Francisella tularensis* y *Aspergillus niger*, respectivamente (Patiño 2010).

Las bacterias fosfato solubilizadoras más frecuentemente aisladas pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Chromobacterium*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Rhodobacter*, *Arthrobacter*, *Serratia* y *Erwinia*, entre otros. Entre los hongos con este potencial se destacan algunas especies de los

géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Scopulariopsis*, *Moniliella* y *Mortierella* (Bobadilla y Rincón 2008, Khan et al. 2009, Patiño 2010 y Kim Won-Il et al. 2011)

1.2.2 Fijación de nitrógeno atmosférico

El nitrógeno es un nutriente fundamental para el desarrollo de las plantas, a pesar de su abundancia es un factor limitante debido a que su asimilación depende del proceso de fijación que es llevado a cabo ya sea por bacterias endosimbióticas o diazótrofes capaces de reducir el nitrógeno a amonio o nitratos (Richardson et al. 2009). Todos los microorganismos que fijan el N_2 lo hacen debido a la actividad de la nitrogenasa, esta enzima junto con la ferredoxina y la flavodoxina y en presencia de ATP, reduce el N_2 a NH_3 , el cual es rápidamente protonado a NH_4^+ . La acción de este complejo enzimático es limitada en presencia de oxígeno de tal manera que los organismos fijadores aerobios poseen mecanismos de protección de la nitrogenasa como la tasa respiratoria elevada y protección conformacional, en la que la enzima cambia a una forma inactiva reversible (Mays-Figueroa 2004).

La fijación simbiótica del nitrógeno es llevada a cabo principalmente por especies de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, los cuales colonizan el interior de las raíces y se establecen tras la formación de nódulos. En general esta relación genera un intercambio de compuestos, la planta provee fuentes de carbono y glutamato a la bacteria y esta le suministra a la planta amonio y algunos aminoácidos (Resendis-Antonio et al. 2007).

Los diazótrofes de vida libre frecuentemente reportados pertenecen a géneros comúnmente encontrados en suelos como *Acetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Gluconobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Klebsiella* (Barua et al. 2011, Roesch et al. 2006). Según Mays-Figueroa en 2004, estos microorganismos excretan amonio que es captado por las plantas y

recientemente, se ha demostrado que incrementan la capacidad radical de absorción de nitratos estimulando el desarrollo radical y el sistema transportador de este compuesto.

1.2.3 Microorganismos celulolíticos

Los microorganismos del suelo se encargan del reciclaje de variadas fuentes de carbono incluyendo la celulosa, el carbohidrato más abundante en la naturaleza. En este proceso actúan un grupo de enzimas denominadas celulasas que catalizan tres tipos de reacciones: las endocelulasas rompen las interacciones no covalentes presentes en la estructura amorfa de la celulosa, mientras las exocelulasas actúan en los extremos de la cadena de la celulosa originando azúcares pequeños que serán hidrolizados hasta obtener glucosa por acción de las β -glucosidasas (Phitsuwan et al. 2012).

La tasa a la cual ocurre la degradación de la celulosa depende de factores ambientales como la temperatura, la aireación y el pH. El pH óptimo para la actividad de las celulasas producidas por bacterias está entre 5 y 9, mientras las producidas por hongos generalmente requieren pH ácido (entre 3,3 y 6) (Howard et al. 2003).

Las bacterias celulolíticas del suelo reportadas más frecuentemente incluyen los filos Proteobacterias, Actinobacteria y Firmicutes destacándose géneros como *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Clostridium* (Pourcher et al. 2001, Talia et al. 2011). Entre los hongos celulolíticos se encuentran los géneros *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Paecilomyces*, *Mucor*, *Cladosporium* y *Chaetomium* (Gaitán y Pérez 2007).

1.3 El ecosistema paramuno

El término páramo se refiere a la vegetación característica de la alta montaña andina dentro de las latitudes 8° Sur y 11° Norte, es decir, desde el Norte del Perú hasta la Sierra Nevada de Santa Marta en Colombia, la cordillera de Talamanca (sector suroriental de los

Andes centroamericanos) y la cordillera de Mérida en Venezuela (Hofstede et al. 2003). Según la definición de Cuatrecasas (1958), el cinturón paramuno se divide de acuerdo a la altitud, entre 3000 a 3500 msnm está el denominado *subpáramo o páramo bajo* que se caracteriza por vegetación arbustiva en la que predominan elementos florísticos de la familia Compositae, el *páramo* propiamente dicho, el cual se extiende entre los 3500 y los 4500 msnm donde prevalecen pastizales y frailejones, y por último el *superpáramo* ubicado por encima de los 4500 msnm caracterizándose por la discontinuidad de la vegetación.

El clima de los ecosistemas paramunos colombianos se caracterizan por presentar una humedad relativa promedio entre 70-85%, aunque puede alcanzar el 100% en temporada de lluvias, valores de precipitación que varían aproximadamente entre los 1000-3000mm anuales y bajas tasas de evapotranspiración debido a las bajas temperaturas y la alta nubosidad. En general se ha establecido que la temperatura en horas sol puede ser superior a los 20 °C y decae por debajo de los 0 °C en la noche, mientras que los porcentaje de radiación solar e insolación cambian notoriamente entre los periodos de lluvia y sequía (Díaz-Granados et al. 2005).

Los suelos de los páramos son de origen volcánico, se caracterizan por tener un pH ácido y acumular una gran cantidad de humus, la porosidad permite un alto grado de infiltración produciendo valores elevados de conductividad hidráulica, con una capacidad de retención del agua significativa ya que en los primeros 30 cm de profundidad el agua ocupa aproximadamente el 60% del volumen total del suelo (Díaz-Granados et al. 2005).

Los biomas paramunos son considerados islas de endemidad respecto a su flora, este fenómeno ha sido explicado por las consecuencias de las eras de hielo del cuaternario, durante los periodos glaciales se permitió una elevada tasa de dispersión de polen y flujo génico entre las zonas más altas de las montañas que posteriormente quedarían aisladas en los periodos interglaciares, restringiendo así la distribución de géneros como *Espeletia*, conocido comúnmente como frailejón, el cual pertenece a la familia Asteraceae,

y comprende 73 especies cuya distribución está confinada entre las cordilleras del norte del Ecuador y la cordillera de Mérida al Oeste de Venezuela (Hooghiemstra y Van der Hammen 2004).

Las especies del género *Espeletia* presentan morfologías muy diferentes entre sí, van desde árboles ramificados con tallos leñosos de hasta 20 m de altura hasta pequeñas rosetas sésiles sin un tallo evidente y cuya altura no sobrepasa los 20 cm. Su evolución es un ejemplo de adaptación a la alta montaña, mientras en los frailejones más primitivos y de tipo arborescente el peciolo tiene una forma tubular, en los de aparición más reciente hay una tendencia a desarrollar un peciolo más aplanado y reducido que favorece la existencia de una cobertura entretejida que protege el cuerpo del tallo (Rivera et al. 2001). Además, presentan pubescencia foliar densa lo cual reduce la transpiración y aumenta la temperatura de la hoja, el aislamiento térmico del tallo por la retención de las hojas secas y el superenfriamiento de las hojas adultas evitando la congelación (Páramo ecosystem 1999).

1.3.1 Sistema de páramos de Antioquia

En el departamento de Antioquia, el sistema de páramos está constituido por el páramo de Sonsón y el de Santa Inés ubicados en la cordillera central y los páramos de Frontino-Urrao y Farallones de Citará localizados en la cordillera occidental.

El páramo de Santa Inés está ubicado entre los 3100 y 3340 msnm y ocupa un área de 1080 ha, corresponde a un bosque pluvial montano, la temperatura promedio fluctúa entre los 10 y 16 °C y la precipitación entre los 1900 y 2200 mm/año, presenta un régimen de lluvias monomodal, con un periodo seco entre diciembre y marzo y uno lluvioso de abril a noviembre. Aunque no se presentan grandes variaciones en el promedio, durante el día se da un contraste térmico que puede llegar a ser hasta de 25 °C de diferencia entre la madrugada y el medio día. En el aspecto geológico, en este complejo predomina la cuarzodiorita del batolito antioqueño, los orígenes de los suelos son rocas

ígneas, plutónicas y graníticas con recubrimientos parciales de cenizas volcánicas (Morales et al. 2007).

El páramo de Frontino-Urrao posee una extensión de 4030 ha de las que aproximadamente el 90% pertenece al Municipio de Urrao, se ubica entre los 3400 y 3930 msnm, presenta un paisaje geomorfológico asociado a montañas de carácter fluviogravitacional, debido a su ubicación este complejo se ve influenciado por las corrientes de aire provenientes del mar Caribe y del océano Pacífico provocando el establecimiento de masas nubosas que junto con las condiciones climáticas se mantienen durante todo el año, aunque parece presentarse una disminución de las lluvias entre enero y marzo, la precipitación promedio anual es superior a los 2000 mm (Morales et al. 2007). El suelo de este complejo está constituido por vulcanitas alteradas o redepositadas por los fenómenos glaciares generándose suelos que presentan propiedades ándicas de alta porosidad, textura media, moderadamente bien estructurados y fuertemente ácidos (Flórez et al. 2004).

1.3.2 Microbiota en suelo de páramos colombianos

La mayoría de estudios microbiológicos realizados en el suelo de los páramos colombianos han estado restringidos al departamento de Cundinamarca y han empleado únicamente metodologías dependientes de cultivo.

Chitiva et al. (2007) determinaron los hongos filamentosos presentes en la rizósfera de *Espeletia killipii* en el páramo de Guasca (3000-3500 msnm), su reporte indica que los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* y *Acremonium* son los más abundantes y diversos. Además, esta investigación incluyó los hongos de la filosfera de *E. killipii* y *E. barclayana* y los géneros *Fusarium*, *Cladosporium*, *Alternaria* y *Epicoccum* fueron aislados de ambas especies.

Posteriormente, Arias y Piñeros (2008) aislaron e identificaron los hongos filamentosos cultivables de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde. Ambos sitios tienen una riqueza de especies muy similar (42 y 43 especies respectivamente), los géneros con mayor incidencia son *Penicillium* y *Aspergillus*. Benavides y Hermida (2008) estudiaron estos mismos sitios con el fin de identificar la flora bacteriana, este análisis se enfocó en el grupo de los Gram positivos, tanto formadores como no formadores de espora, y se reportó la presencia de géneros como: *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Amphibacillus*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina*, *Brochothrix*, *Lactobacillus* entre otros.

Bernal et al. (2006) analizaron la composición de la microbiota cultivable presente en la hojarasca de bosque ubicado a 3.373 msnm en el páramo de Guerrero, obtuvieron que el recuento total de microorganismos fue de 22×10^6 UFC/g, los morfotipos bacterianos aislados fueron identificados como *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp. y *Pseudomonas* y en el caso de los hongos se reporta *Penicillium*, *Cladosporium* y *Rhodotorula*.

Las técnicas no dependientes de cultivo han comenzado a ser implementadas en el estudio de la microbiota del suelo de estos ecosistemas en nuestro país. Recientemente, Montaña et al. (2011) realizaron la asignación taxonómica de una librería metagenómica obtenida a partir de una muestra de suelo de bosque alto andino del Parque Nacional Natural de los Nevados, localizado a 3.464 msnm, en este estudio se reportó que los órdenes más frecuentes fueron Actinomycetales, Rhizobiales y Burkholderiales, siendo los géneros *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Bradyrhizobium* y *Frankia* los más representativos.

El único reporte de la microbiota funcional en páramos es la investigación de Moratto et al. (2005) en el cual se evalúa el efecto del uso del suelo sobre las bacterias diazotróficas y los hongos fosfato solubilizadores en el páramo de Guerreo. Los resultados mostraron que el recuento de diazótrofos fue mayor en el bosque que en aquellos suelos cultivados, fenómeno explicado por la inhibición que ejerce la aplicación de agroquímicos con

nitrógeno combinado, los géneros reportados fueron *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Pseudomonas* y *Derxia*. En el caso de los hongos solubilizadores de fósforo se identificaron géneros como *Mucor*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Gliocladium* y *Humicola* los cuales presentaron índices de solubilización entre el 17 y 2.4.

2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Colombia es considerada una de las tres naciones megadiversas del mundo (Mittermeier et al. 1997) y a su vez el norte de los Andes, gran parte del cual está localizado en Colombia, ha sido definido como una de las regiones con la mayor diversidad de especies por unidad de área en el mundo (Henderson et al. 1991). El acervo biológico del que dan cuenta los estudios que han permitido las consideraciones anteriormente planteadas está limitado a la fauna y flora de estas regiones, pasando por alto la microbiota que sustenta estos ecosistemas. El desconocimiento científico sobre la biota microbiana de nuestro país es alarmante si consideramos que un gramo de suelo no tropical contiene aproximadamente 10^6 células bacterianas, dentro de las que se encuentran aproximadamente 5.000 especies diferentes.

Los ecosistemas paramunos son particulares en las condiciones climáticas, presentando características que se consideran extremas para la mayoría de los organismos; la nubosidad, la humedad atmosférica y del suelo son altas y la temperatura fluctúa durante el día en un rango de 25 °C. En los páramos de Antioquia no se han realizado estudios encaminados a establecer la composición de las comunidades microbianas en el suelo, ni sobre su dinámica de acuerdo con las variaciones climáticas. El conocimiento del efecto de las temporadas climáticas sobre la microbiota permitirá entender la respuesta de estas de acuerdo a la versatilidad fisiológica, la cual ya ha sido reportada para este grupo biológico en la adaptación a condiciones extremas. En Colombia las investigaciones se han realizado en páramos de la cordillera oriental (páramo de Guasca, páramo el Tablazo, páramo Guerrero y páramo Cruz Verde) estudiando bacterias y hongos de diferentes

microhábitats como suelo, filósfera y hojarasca (Bernal et al. 2006, Chitiva et al. 2007, Arias y Piñeros 2008 y Benavides y Hermida 2008).

En este contexto surgen las siguientes preguntas: ¿es posible establecer diferencias entre las biomásas de los grupos microbianos asociados a la rizósfera de *Espeletia* sp. de los páramos de Santa Inés y Urrao? y ¿cómo los periodos de lluvia y sequía afectan las biomásas de los grupos microbianos en cada páramo?.

3. HIPÓTESIS

Si el aislamiento espacial de las comunidades microbianas asociadas a *Espeletia* sp. en los páramos de Urrao y Santa Inés ha sido significativo y dado que los suelos y las condiciones ambientales son diferentes entonces debe existir diferencias entre ambas comunidades.

Si la disponibilidad de agua es una variable determinante para el establecimiento o desarrollo de algunas poblaciones microbianas entonces la temporada de lluvias en comparación a la temporada de sequía debe generar cambios en la biomasa de microorganismos presentes en el suelo rizosférico de *Espeletia* sp.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Determinar la biomasa de diferentes grupos microbianos asociados a la raíz del género *Espeletia* sp. en dos páramos ubicados en el departamento de Antioquia durante dos temporadas climáticas diferentes.

4.2 Específicos

- Caracterizar fisicoquímicamente el suelo rizosférico de *Espeletia* sp. de los páramos de Santa Inés y de Urrao.
- Establecer la biomasa de grupos bacterianos y hongos asociados a la rizósfera de *Espeletia* sp. para ambos páramos en temporada de sequía y lluvia.
- Establecer la biomasa bacteriana asociada a el suelo rizosférico de *Espeletia* sp. con potencial como fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fosfato y degradadores de celulosa.
- Caracterizar el potencial de la microbiota de suelo de páramos como solubilizadores de fosfato y degradadores de celulosa.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Sitios de estudio

Las áreas de estudio se encuentran localizadas en el complejo de Santa Inés ubicado a 3216 msnm, N 6°37.919' W 75°38.669', en el municipio de Belmira y el complejo Frontino-Urrao el cual está a 3580 msnm, N 6°27.349' W 75°5.313'.

Los muestreos en el páramo de Santa Inés se realizaron en los meses de febrero (época de sequía) y junio (época de lluvia) de 2012, y en el páramo de Urrao en los meses de marzo (época de sequía) y mayo (época de lluvia).

En los sitios de estudio se realizaron mediciones de temperatura, humedad relativa e intensidad lumínica a nivel de las hojas de los frailejones y del suelo utilizando un termohigrómetro (HANNA HI 8564) y un luxómetro (Traceable® Dual-Range Light Meter). Además, se registró la altura y envergadura de los frailejones con el fin de caracterizar los individuos del área muestreada.

5.2 Recolección de las muestras

Se hicieron muestreos aditivos de la rizósfera de *Espeletia* sp. en cada sitio en dos temporadas climáticas diferentes. Cada muestra consistió en la mezcla de suelo rizosférico de 30 plantas seleccionadas al azar el cual se tomó haciendo raspados de las raíces. Las muestras fueron almacenadas en recipientes de plástico estériles y transportadas bajo refrigeración al laboratorio, manteniéndolas en esta condición hasta el momento del análisis.

5.3 Caracterización fisicoquímica del suelo

Los parámetros físicos y químicos del suelo fueron analizados de la siguiente manera: la Capacidad de Intercambio Catiónico Efectiva (CICE) fue determinada mediante valoración ácido base y extracción con acetato de amonio, el pH se midió con un potenciómetro a partir de una suspensión de suelo en agua 1:1. El porcentaje de materia orgánica se estableció de acuerdo al método de Walkley Black y a partir de este se calculó el de nitrógeno, el contenido de fósforo fue valorado por colorimetría aplicando el procedimiento de Bray II, la cantidad de aluminio se calculó haciendo una valoración ácido base siguiendo el método de Yuang (HCl). La concentración de azufre se determinó por colorimetría a partir de la extracción con fosfato de calcio monobásico 0.008 M y la del boro por turbidimetría usando el mismo extractante. Las bases de cambio (calcio, magnesio, potasio y sodio) y los micronutrientes (hierro, cobre, manganeso y zinc) fueron calculados mediante absorción atómica de una extracción con acetato de amonio y ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) respectivamente y por último, la textura fue valorada al tacto.

5.4 Determinación de la biomasa microbiana de la rizósfera de *Espeletia* sp.

Para la cuantificación de los grupos bacterianos y hongos presentes en el suelo rizosférico de *Espeletia* sp. se utilizó el método de siembra en superficie de diluciones seriadas y determinación de las Unidades Formadoras de Colonias por gramo de suelo (UFC/g)

(Koch 1994). Se realizaron diluciones en factor de 10 en solución salina al 0.85% y se sembraron alícuotas de 100 μ L en medios de cultivo para cada grupo microbiano.

La biomasa microbiana se determinó como el número de UFC por gramo de suelo utilizando la fórmula:

$$\text{UFC/g}_{\text{suelo}} = \# \text{ Colonias} \times \frac{\text{Factor de dilución}}{\text{Alícuota}}$$

Para los recuentos de bacterias heterótrofas totales las alícuotas se sembraron en agar nutritivo (peptona de carne 5 g, extracto de carne 3 g y agar-agar 12 g por litro de agua destilada).

Para determinar la biomasa de bacilos Gram negativos (BGN) se hicieron siembras en agar EMB, eosina azul de metileno, (peptona 10 g, K_2HPO_4 2 g, lactosa 5 g, sacarosa 5 g, eosina amarillenta 0.4 g, azul de metileno 0.07 g y agar-agar 13.5 g por litro).

La siembra para determinar la biomasa de *Pseudomonas* (P) se realizó en agar King B (proteosa-peptona 20 g, MgSO_4 1.5 g, K_3PO_4 1.8 g, glicerol 10 g y agar-agar 10 g por litro), como control del medio para realizar los recuentos de *Pseudomonas* fluorescentes se utilizó una cepa referencia de *Pseudomonas aeruginosa*. En este medio de cultivo las colonias que corresponden a *Pseudomonas* fluorescentes se observan de color amarillo fluorescente al ser expuestas a luz ultravioleta. Posteriormente se verificó la identidad taxonómica de las colonias aisladas como *Pseudomonas* mediante pruebas bioquímicas convencionales de fermentación de glucosa y lactosa, utilización del citrato, hidrólisis de urea y gelatina, motilidad y producción de indol.

La biomasa de bacterias aerobias esporulantes (BAFE) fue establecida al someter las diluciones a baño María a 80 °C durante 20 min, las cuales fueron sembradas en agar tripticosa de soya (peptona de caseína 15 g, peptona de harina de soya 5 g, NaCl 5 g y agar-agar 15 g por litro).

Pasadas 48 horas de crecimiento a temperatura ambiente, se procedió a realizar el recuento de estos grupos bacterianos, se describieron y aislaron los diferentes morfotipos.

La biomasa de actinobacterias (AB) fue determinada mediante siembras en agar almidón caseína (almidón soluble 10 g, K_2HPO_4 2 g, NaCl 2 g, caseína 1 g, $MgSO_4$ 0.05 g, $CaCO_3$ 0.02 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g y agar-agar 15 g por litro) (Fonseca et al. 2011) y el recuento y aislamiento de morfotipos se hizo después de 12 días de incubación a temperatura ambiente.

El recuento de hongos filamentosos (HF) y levaduras (HL) se realizó en PDA, agar papa dextrosa, (extracto de papa 4 g, glucosa 20 g, agar-agar 15 g por litro), suplementado con gentamicina para inhibir el crecimiento de bacterias, el número de UFC/g de hongos y aislamiento de los morfotipos se llevó a cabo pasados cinco días de incubación a temperatura ambiente.

5.5 Determinación de la biomasa de bacterias con potencial para fijar nitrógeno, solubilizar fósforo inorgánico y degradar la celulosa.

Con el fin de determinar la biomasa bacteriana capaz de fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar fósforo inorgánico e hidrolizar celulosa se realizaron recuentos de UFC/g en medios específicos.

El recuento de bacterias fijadoras de nitrógeno (FN) se hizo en el agar levadura-manitol (K_2HPO_4 0.5 g, $MgSO_4$ 0.4 g, NaCl 0.1 g, manitol 10 g, extracto de levadura 0.5 g, rojo congo 0.025 g y agar-agar 15 g por litro). La biomasa de fijadores de nitrógeno tipo *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* se estableció mediante el conteo de colonias con la morfología característica, color rosado tenue y blanco, respectivamente. Los conteos se realizaron pasadas 48 horas de incubación a temperatura ambiente.

La cuantificación de la biomasa bacteriana solubilizadora de fosfatos inorgánicos (BSP) se hizo sembrando alícuotas de las diluciones en agar Pikovskaya (PVK) compuesto de glucosa 10 g, extracto de levadura 0.5 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, KCl 0,2 g, MgSO_4 0.1 g, MnSO_4 0.0001 g, FeSO_4 0.0001 g y agar-agar 15 g por litro. En este medio los microorganismos solubilizadores presentan un halo transparente alrededor producto de la solubilización del fósforo rodeando la colonia. Después de cinco días de incubación se contaron las colonias positivas y para confirmar este carácter funcional cada colonia fue sembrada de manera aislada en el mismo medio.

El recuento de las bacterias celulolíticas (BC) se realizó en agar carboximetilcelulosa (CMC) compuesto de NaNO_3 2 g, K_2HPO_4 1 g, MgSO_4 0,5 g, KCl 0.5 g, sal de CMC 2 g, Peptona 0.2 g y agar-agar 15 g por litro (Kasana et al. 2008). A los cinco días de incubación, los diferentes morfotipos observados fueron purificados en agar nutritivo para su conservación y se añadió lugol (KI 1.33%, I 0.66%) al medio en el que se hicieron los recuentos. El lugol se intercala entre la molécula de celulosa cuando no hay degradación observándose un color marrón, cuando hay degradación el lugol no se intercala y se forma un halo transparente alrededor de la colonia. Los aislados fueron evaluados individualmente para corroborar la producción de celulasas.

5.6 Evaluación del potencial de los microorganismos para hidrolizar la celulosa y solubilizar fosfatos.

Los hongos aislados fueron sembrados individualmente en agar CMC y PVK por duplicado, una vez las colonias alcanzaron un diámetro aproximado de 3 cm se registró el tamaño del halo alrededor de la colonia para cada ensayo. Como control positivo de la producción de celulasas se utilizó una cepa de *Aspergillus niger*.

Para cuantificar los potenciales metabólicos de los aislados obtenidos a partir de los recuentos de bacterias celulíticas y solubilizadoras, las colonias fueron sembradas

individualmente en agar CMC y PVK por duplicado. Pasadas 72 horas de incubación a temperatura ambiente, se registró el tamaño de la colonia y del halo para cada ensayo.

La actividad solubilizadora y celulolítica fue determinada mediante el índice:

$$\text{Índice actividad} = \frac{\text{Diámetro externo (halo)}}{\text{Diámetro colonia}}$$

5.7 Análisis de datos

Para determinar si las variables ambientales medidas en campo eran diferentes entre y dentro de cada sitio se realizaron pruebas de comparación de medias (U Mann Whitney) en IBM SPSS 20 Software. La biomasa de los grupos microbianos y funcionales fue determinada haciendo tres análisis de cada muestra de suelo, con cinco replicas por dilución. Los diferentes morfotipos fueron designados conforme a sus características macro y microscópicas y se establecieron índices de diversidad (Shannon-Weaver) y similitud (Jaccard) para los grupos evaluados, excepto *Pseudomonas*. Se realizó un análisis de Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS, siglas en inglés) en el programa estadístico R para establecer las relaciones entre las variables.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización de los sitios de muestreo

La vegetación en los sitios muestreados está dominada por *Espeletia* sp. y su distribución y tamaño varía en cada uno de estos, la cobertura es más densa en el páramo de Urrao que en Santa Inés donde su tamaño también es menor, con una altura media de 100 cm (28-177 cm), mientras que en Urrao presentan una altura superior con un promedio de 133 cm (27-235 cm). Además se observaron diferencias en cuanto a la vegetación

acompañante, en Urrao predominan representantes del género *Sphagnum*, mientras los pastizales recubren gran parte del suelo en Santa Inés.

Respecto a las condiciones climáticas evaluadas, temperatura, intensidad lumínica y humedad, el test de medias indicó diferencias en las dos épocas estudiadas para cada páramo y entre páramos. En ambos sitios el comportamiento de las mediciones de temperatura e intensidad lumínica en el momento del muestreo indicaron valores mayores en Santa Inés. En cuanto a la humedad se registraron valores mayores en el páramo de Urrao, como se muestra en la figura 1.

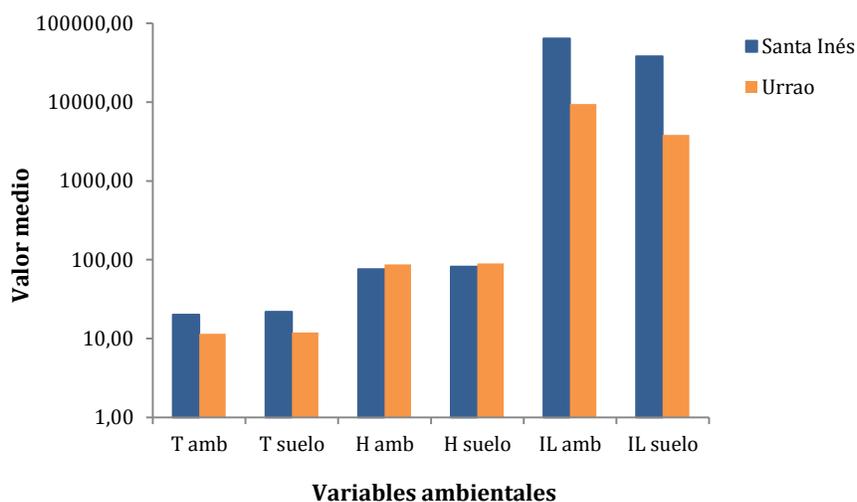


Figura 1. Valores registrados para la temperatura (T), humedad relativa (H) e intensidad lumínica (IL) a nivel de las hojas (amb) y a nivel del suelo.

La temperatura atmosférica y a nivel del suelo en el páramo de Santa Inés en la época de sequía fue mayor que en la época de lluvia, en 3.9 °C y 5.1 °C, respectivamente. La humedad relativa fue mayor en la época de lluvia, a la altura de las hojas 17.15% y a nivel del suelo de 11.98%. En el páramo de Urrao los registros de temperatura fueron mayores en la lluvia en 2.7 °C tanto a nivel del suelo como a la altura de las hojas y la humedad también aumentó, en un 13.3% para la humedad ambiental y en un 11.2% en la humedad a nivel del suelo.

6.2 Propiedades fisicoquímicas del suelo

El suelo en las dos localidades era húmedo con textura franca, variando la coloración, siendo más oscura en el páramo de Urrao, que en Santa Inés. Los suelos de los sitios se caracterizan por ser fuertemente ácidos, los valores de materia orgánica, nitrógeno y sodio son mayores en la temporada de sequía, por el contrario la concentración de fósforo, boro y cobre aumentan en la de lluvia. Al comparar el contenido de los macro y micronutrientes de los suelos de los dos páramos se observó que en general son más elevados en Urrao que en Santa Inés, destacándose las concentraciones de hierro, azufre, potasio, magnesio y manganeso (tabla 1).

Tabla 1. Características fisicoquímicas de los suelos en los sitios de estudio.

Parámetro	Santa Inés		Urrao	
	Sequía	Lluvia	Sequía	Lluvia
pH	4.49	4.17	4.32	4.3
Materia orgánica (%)	12.99	10.45	38.02	32.59
Nitrógeno (%)	0.65	0.52	1.9	1.63
Fósforo (ppm)	0.81	12.61	27.94	31.44
Potasio (meq/100g)	0.25	0.14	0.99	1.84
Magnesio (meq/100g)	0.15	0.13	1.07	1.16
Calcio (meq/100g)	0.75	0.47	1.39	1.63
Aluminio (meq/100g)	2.81	2.3	2.72	3.46
Sodio (meq/100g)	0.17	0.12	0.32	0.31
Azufre (ppm)	6.68	1.05	8.38	9.44
Hierro (ppm)	337.88	386	549.5	504.75
Boro (ppm)	0.06	0.14	0.03	0.04
Cobre (ppm)	0.36	0.77	0.32	0.77
Manganeso (ppm)	452	1.43	17.84	21.44
Zinc (ppm)	1.98	1.12	2.39	2.37
CICE (meq/100g)	4.12	3.16	6.49	8.4
Textura	Franca	Franca	Franca	Franca

6.3 Determinación de la biomasa microbiana

Las biomases de los grupos microbianos evaluados presentan un patrón proporcional en los dos páramos. Las mayores abundancias se registraron en los grupos bacterias heterótrofas (1.55×10^6 UFC/g en Urrao y 1.29×10^6 UFC/g en Santa Inés) seguido por, bacilos Gram negativos, levaduras, hongos filamentosos, *Pseudomonas*, BAFE y actinobacterias. El grupo que presentan la mayor variación entre sitios es el de los BAFE cuya biomasa es 3.8 veces mayor en Urrao (figura 2). La relación hongo/bacteria (0.46) es mayor en Santa Inés que en Urrao (0.30).

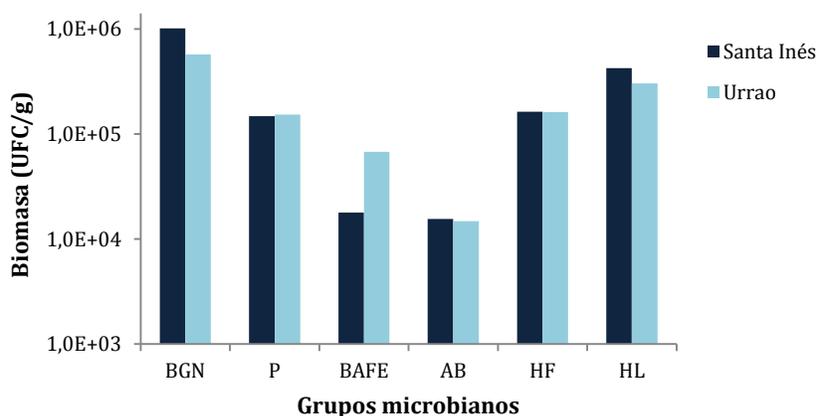


Figura 2. Biomasa (UFC/g) para cada grupo microbiano evaluado en los páramos de Santa Inés y Urrao.

La distribución de la abundancia relativa presenta variaciones entre los páramos siendo notorio el porcentaje de BAFE, el cual es 5 veces mayor en Urrao. El grupo de los bacilos Gram negativos cambia en 12 puntos porcentuales, siendo mayor en Santa Inés. Los grupos de *Pseudomonas* y hongos filamentosos son menores entre 3 y 4 puntos porcentuales en Santa Inés, mientras que las actinobacterias presentan un leve aumento en Urrao (0.3%) y el grupo de las levaduras representa el mismo porcentaje en ambos páramos (figura 3).

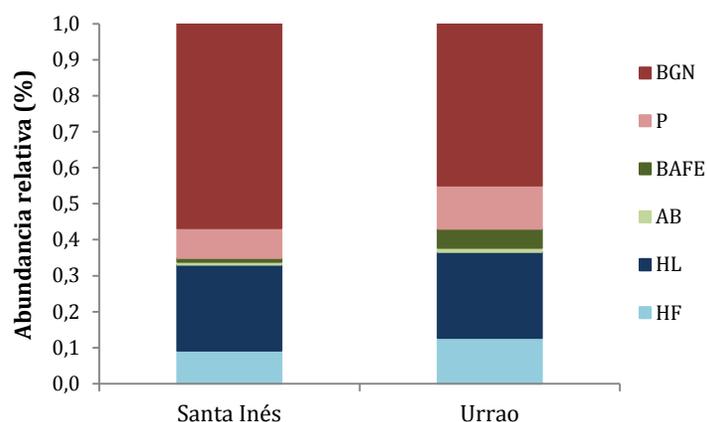


Figura 3. Proporción de cada uno de los grupos microbianos para cada sitio de muestreo.

Las mayores diferencias entre los sitios de muestreo se reflejaron en los morfotipos registrados. Los índices Jaccard mostraron que el grupo más similar entre ambos sitios correspondió a actinobacterias (0.444), seguido de BAFE (0.242) y bacilos Gram negativos (0.039). En el grupo de hongos las levaduras presentan una mayor similaridad (0.250) que la de los hongos filamentosos (0.021).

6.3.1 Efecto de las condiciones climáticas sobre la microbiota del páramo de Santa Inés.

Las biomásas de los grupos evaluados mostraron cambios considerables entre temporadas. Los grupos bacterianos y las levaduras fueron mayores en la temporada de sequía, los bacilos Gram negativos y las actinobacterias presentaron las mayores variaciones siendo 1.42 y 1.7 veces mayores en esta temporada, respectivamente. Por el contrario, los hongos filamentosos registraron un aumento en lluvia de 1.29 veces el valor en sequía (figura 4). El índice hongo/bacteria mostró un aumento en la temporada de lluvia, pasando de 0.40 a 0.52.

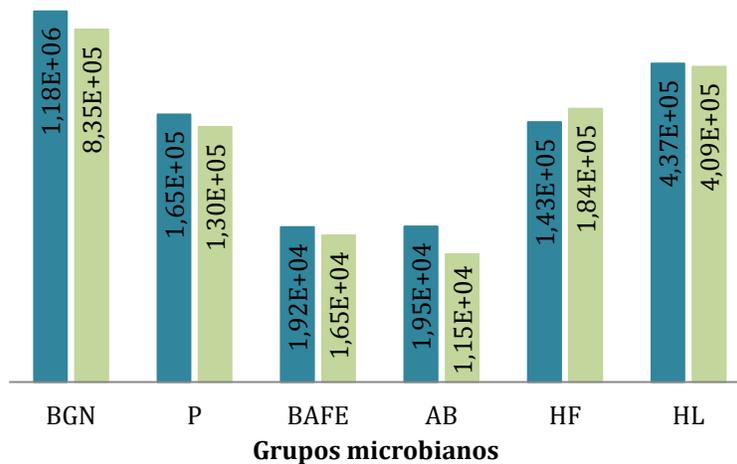


Figura 4. Comparación de la biomasa de cada grupo evaluado entre las temporadas de sequía (azul) y lluvia (verde) en el páramo de Santa Inés.

Los índices de diversidad, riqueza y similaridad establecidos para cada grupo analizado en cada temporada se muestran en la tabla 2. En todos los casos la riqueza de morfotipos y la diversidad presentaron una relación directa, los índices de similaridad entre las poblaciones de cada grupo por temporada no superaron el 0.45, excepto para las levaduras donde no se visualizó cambios en los morfotipos (similaridad = 1).

Tabla 2. Índices de riqueza, diversidad y similaridad para los grupos evaluados en cada temporada climática en Santa Inés.

Grupo	Temporada	Riqueza	Diversidad	Similaridad
BGN	S	40	3.080	0.441
	L	45	3.278	
AB	S	13	2.347	0.400
	L	8	1.845	
BAFE	S	13	2.129	0.250
	L	7	1.740	
HF	S	35	3.316	0.018
	L	21	2.754	
HL	S	2	0.677	1.000
	L	2	0.668	

6.3.2 Efecto de las condiciones climáticas sobre la microbiota del páramo de Urrao.

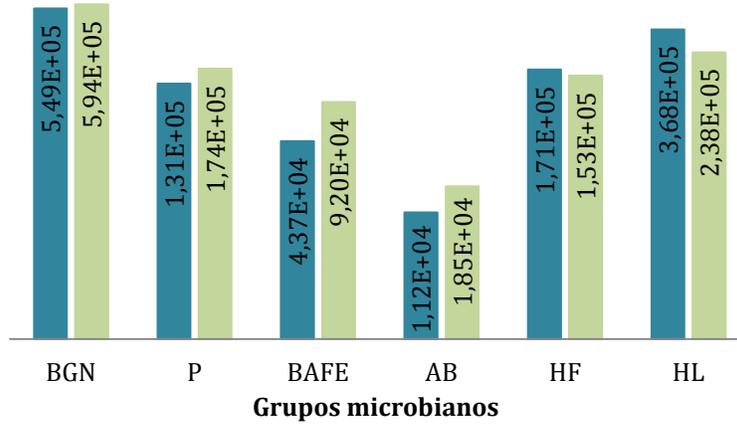


Figura 5. Comparación de la biomasa de cada grupo evaluado entre las temporadas de sequía (azul) y lluvia (verde) en el páramo de Urrao.

En el páramo de Urrao, las biomazas de los grupos microbianos muestran variaciones entre temporadas. En general los grupos bacterianos incrementaron en la temporada de lluvia, el grupo de los BAFE mostró una duplicación de su biomasa, seguido de las actinobacterias y *Pseudomonas* las cuales fueron 1.65 y 1.32 veces mayores en esta temporada. Por el contrario, los hongos filamentosos y levaduras fueron 1.12 y 1.55 veces mayores en sequía (figura 5). La relación hongo/bacteria muestra una disminución de 0.39 a 0.23 para la época de lluvia.

Tabla 3. Índices de riqueza, diversidad y similaridad para los grupos evaluados en cada temporada climática en Urrao.

Grupo	Temporada	Riqueza	Diversidad	Similaridad
BGN	S	30	2.952	0.396
	L	37	3.161	
AB	S	7	1.581	0.545
	L	10	2.008	
BAFE	S	15	2.446	0.150
	L	8	1.635	
HF	S	23	2.804	0.049
	L	20	2.668	
LEV	S	3	1.021	0.667
	L	2	0.646	

Los índices de riqueza y similitud presentaron una relación directa, los índices de similitud entre las poblaciones de cada grupo por temporada muestran que las levaduras y las actinobacterias son los grupos con menos variación entre temporadas, mientras los hongos filamentosos solo comparten un 4.9% de los morfotipos (tabla 3).

6.3.3 Relaciones entre las variables, la temporada y el páramo

El análisis NMDS (figura 6) mostró una separación entre los sitios de estudio (NMDS 1) y dentro de cada sitio de acuerdo a la temporada climática (NMDS 2). El porcentaje de materia orgánica, nitrógeno, fósforo y la biomasa de BAFE, son las variables que caracterizan el páramo de Urrao.

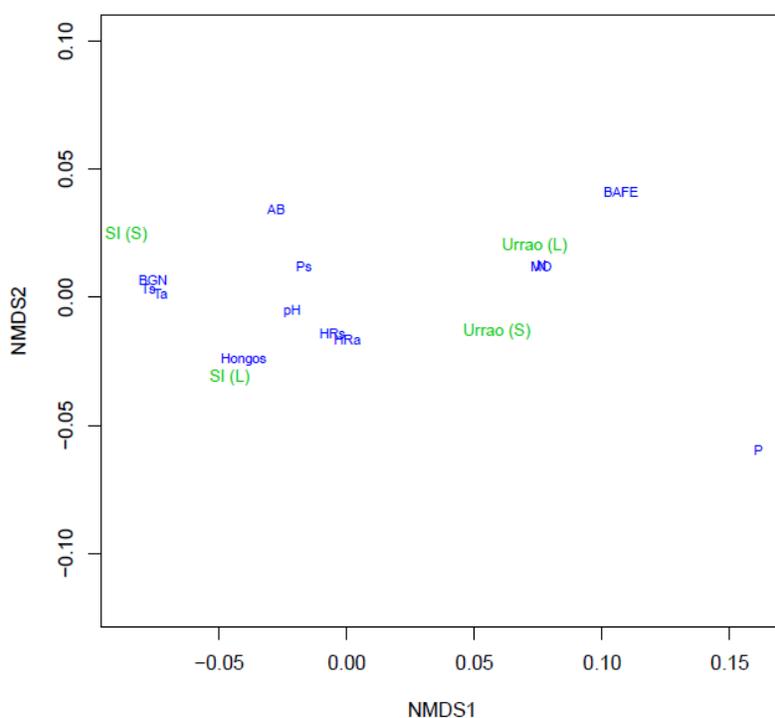


Figura 6. Plano de ordenación obtenido por NMDS. Páramo de Santa Inés (SI), lluvia (L), sequía (S), temperatura atmosférica (Ta), temperatura a nivel del suelo (Ts), humedad atmosférica (HRa), humedad a nivel del suelo (HRs), bacilos Gram negativos (BGN), *Pseudomonas* (Ps), actinobacterias (AB), materia orgánica (MO), nitrógeno (N), fósforo (P). La materia orgánica se observa sobre puesta con el nitrógeno.

6.4 Biomasa de los grupos funcionales

Se evaluó la cantidad de microorganismos que presentan potencial para solubilizar fosfatos, degradar la celulosa y fijar nitrógeno atmosférico, la biomasa microbiana total de estos grupo es similar en ambos páramos 5.89×10^5 UFC/g en Santa Inés y 4.99×10^5 UFC/g en Urrao. Los microorganismos fijadores de nitrógeno tipo *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* presentaron mayor biomasa, 3.38×10^5 UFC/g en Santa Inés y 2.75×10^5 UFC/g en Urrao; seguido de bacterias celulolíticas con 1.59×10^5 UFC/g y 1.52×10^5 UFC/g en Santa Inés y Urrao, respectivamente, el grupo con menor biomasa fue el de bacterias solubilizadoras de fosfatos con 9.23×10^4 UFC/g en Santa Inés y 7.13×10^4 UFC/g en Urrao. En consecuencia con esto la distribución de la abundancia relativa de bacterias con los potenciales metabólicos evaluados es muy similar en ambos sitios de estudio (figura 7).

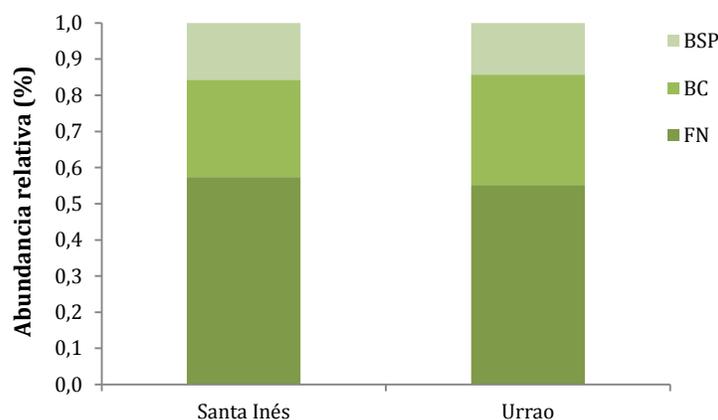


Figura 7. Proporción de la abundancia relativa de microorganismos fijadores de N, solubilizadores de P y celulolíticos en los páramos de Santa Inés y Urrao.

6. 5 Evaluación del potencial metabólico

6.5.1 Actividad celulolítica

A partir del suelo del páramo de Santa Inés se aislaron 48 microorganismos celulolíticos 23 bacterianos (12 Gram positivos y 11 Gram negativos) y 35 fúngicos (62.5% del total de aislados). En total fueron aislados 48 microorganismos celulolíticos del páramo de Urrao

20 (11 Gram positivos y 9 Gram negativos) bacterianos y 28 fúngicos (65% del total de aislados). Los hongos presentaron los índices de hidrólisis más bajos, entre 1.1 y 2.2, mientras la capacidad metabólica de los aislados bacterianos estuvo entre 1.3 hasta 14.5.

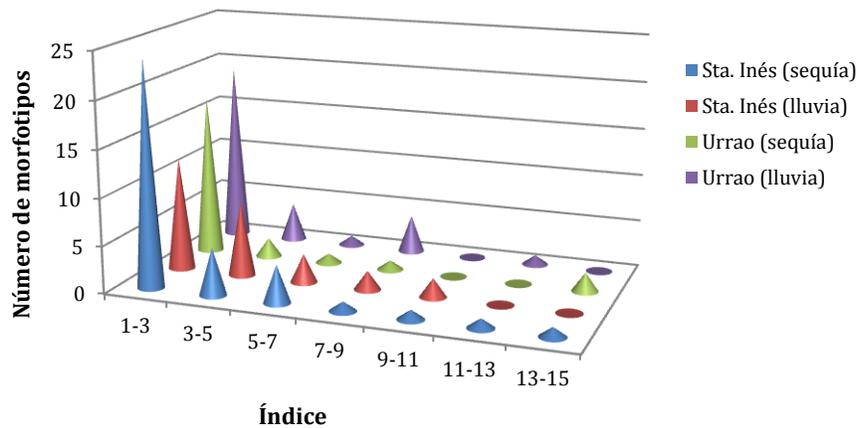


Figura 8. Distribución de los aislados celulolíticos según el índice de hidrólisis.

Los asilados B1CMC4 (Gram negativo) y U1CMC3 (Gram positivo) presentaron índices iguales o superiores a 14. En la figura 8 se muestra la distribución de los aislados según el índice de hidrólisis de la celulosa, para ambos sitios en las dos temporadas.

6.5.2 Solubilización de fosfato inorgánico

En total fueron aislados 13 microorganismos fosfato solubilizadores del páramo de Santa Inés 12 bacterianos (11 Gram negativos y 1 Gram positivo) y 1 fúngico. En Urrao fueron aislados 12 microorganismos fosfato solubilizadores, 11 bacterianos (todos Gram negativos) y 1 fúngico. El índice de solubilización de los hongos fue de 1.1 y 1.2 mientras la capacidad metabólica de los aislados bacterianos fluctúa desde 1.1 hasta 2.2. Como se observa en la figura 9, la distribución de los morfotipos según el índice de solubilización mostró uniformidad en la capacidad metabólica de los aislados de cada sitio de estudio.

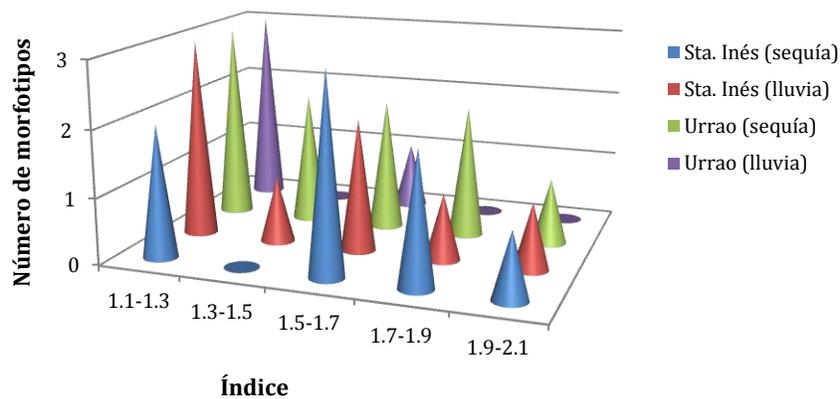


Figura 9. Distribución de los aislados solubilizadores de fosfatos según el índice de solubilización.

7. DISCUSIÓN

Los registros de las características climáticas determinadas en este estudio permitieron establecer que los páramos de Santa Inés y de Urrao presentan condiciones diferentes. La época de lluvia en el páramo de Santa Inés, se caracterizó por una disminución en la temperatura de hasta 5 °C respecto a la sequía; mientras que en el páramo de Urrao esta variación no permite diferenciar las temporadas, sin embargo, lo que caracterizó la época de lluvia en ambos páramos fue el aumento en el porcentaje de humedad relativa.

En los páramos estudiados los valores de pH del suelo fueron fuertemente ácidos, lo cual ya ha sido reportado como una generalidad para los suelos de páramos alto andinos (Díaz-Granados et al. 2005). Los porcentajes de materia orgánica y nitrógeno caracterizaron diferencialmente los suelos de los páramos estudiados, el páramo de Urrao presentó mayor contenido (3 veces) que el valor registrado en Santa Inés. Los estudios en suelos de páramos han indicado que estos presentan altos valores de materia orgánica debido a que procesos como la descomposición de hojarasca se ralentizan como consecuencia de las bajas temperaturas (Díaz-Granados et al. 2005).

Aunque el objeto de estudio en ambos páramos fue la comunidad microbiana asociada a la rizósfera de *Espeletia* sp., los sitios presentan características particulares de acuerdo a los resultados de las variables climáticas y las propiedades fisicoquímicas del suelo las cuales influyen en la distribución de las biomasas de los grupos microbianos evaluados ya que el crecimiento y el metabolismo microbiano puede ser limitado por la temperatura y la humedad, las cuales a su vez interfieren en la difusión y disponibilidad de nutrientes (Landesman y Dighton 2011).

Estudios empleando metodologías independientes de cultivo se ha mostrado que las bacterias Gram negativas predominan en los suelos rizosféricos debido a que la disponibilidad de nutrientes es mayor en estos (Holding 1960), en este trabajo los resultados también mostraron que los bacilos Gram negativos fueron dominantes en la rizósfera de *Espeletia* sp. en los dos sitios de estudio. En Santa Inés la lluvia afectó la concentración de bacilos Gram negativos registrándose una disminución en un 29.3%, sin embargo la riqueza y la diversidad aumentaron ya que se determinaron nuevos morfotipos. Por el contrario en el páramo de Urrao este grupo aumentó en su biomasa (8.13%), en el índice de riqueza y de diversidad. Ese mismo patrón de aumento o disminución de la biomasa en cada páramo se observó para la población de *Pseudomonas* ya que como se ha evidenciado estas conforman una parte importante de la comunidad de bacilos Gram negativos y su dinámica se ajusta a la de este grupo.

Las investigaciones han reportado que la baja concentración de nutrientes (bajas tasas C:N) es una de las condiciones que favorecen la esporulación de las bacterias (Brandes et al. 2011), sin embargo, los resultados obtenidos muestran que la mayor biomasa de bacterias esporulantes se encuentra en el páramo de Urrao donde se presentaron los mayores valores de materia orgánica. Los valores de biomasas registrados para las poblaciones de BAFE presentaron una disminución del 14.2% en la temporada de lluvia en Santa Inés, consecuentemente el número de morfotipos y la diversidad es mayor en temporada de sequía, estos hallazgos están en acuerdo con estudios que muestran como la abundancia de este grupo, en especial el género *Bacillus*, es significativamente mayor

en suelos no inundados (Graff y Conrad 2005). Contrario a lo reportado por la literatura, la temporada de lluvia favoreció significativamente el establecimiento de BAFE en el páramo de Urrao, sin embargo, la diversidad y la riqueza disminuyeron, este comportamiento diferencial entre los páramos probablemente este explicado por la respuesta específica de las poblaciones, lo que se puede demostrar por el bajo índice de similaridad entre páramos. Unir esto con el primer párrafo

En general las actinobacterias presentan las menores biomásas de los grupos evaluados, esto se debe a que por lo general, los miembros de esta comunidad adoptan la estrategia K, creciendo lentamente en especial en suelos muy húmedos (Cruz-Martínez et al. 2009). En el grupo de las actinobacterias se encontró que la dinámica cambia diferencialmente dentro de cada páramo. En Santa Inés su biomasa disminuyó en la época de lluvia en 41.3%, así como la riqueza y diversidad de morfotipos, puede ser explicado por la supresión de poblaciones estrictamente aerobias susceptibles a la disminución de su abundancia cuando se aumenta el contenido de agua en el suelo (Cruz-Martínez et al. 2009). Por el contrario, en Urrao su biomasa aumentó en un 64.9% y consecuentemente se registró un aumento en la riqueza y diversidad. Aunque en ambos páramos se encuentran en la temporada de lluvia una gran cantidad de morfotipos comunes con distribuciones muy similares, en Urrao se aislaron morfotipos exclusivos de la temporada de lluvias, lo cual explicaría el incremento en biomasa para esta temporada. Lo observado se corresponde con lo descrito por Landesman y Dighton (2011), los cuales analizaron la respuesta de la microbiota a la lluvia en suelos secos y húmedos, mostrando que este grupo puede responder positivamente a los continuos pulsos de agua incrementando su abundancia como sucede en Urrao, donde la precipitación y humedad tienden a mantenerse constantes en el tiempo.

En el grupo de los hongos filamentosos, en la temporada de lluvia en el páramo de Santa Inés se registró un aumento del 28.9% de la biomasa, sin embargo, la riqueza y diversidad disminuyeron. La variable estudiada que puede explicar este aumento es la disminución en el pH, ya que se ha visto que la acidez del suelo favorece

preferencialmente a los hongos, fenómeno que también fue visualizado con el incremento en la relación hongo/bacteria para la época de lluvia en la cual el pH es de 0.3 unidades menor (Strickland y Rousk 2010). En contraste, en el páramo de Urrao se presentó una disminución tanto de la biomasa (10.9%) como de los índices de riqueza y diversidad para la temporada de lluvia al igual que la relación hongo/bacteria aún cuando el pH no mostró variación. Por otro lado, la relación hongo/bacteria fue menor en Urrao que en Santa Inés, lo que podría ser explicado como un efecto negativo de los altos contenidos de C y N sobre la biomasa fúngica en Urrao, correspondiéndose con los hallazgos de Bardgett y McAlister (1999), quienes observaron que la relación hongo/bacteria era mayor en pastos donde los contenidos de C y N eran bajos en comparación con aquellos sitios que recibían grandes cantidades de fertilizantes.

Un aporte de este trabajo es el registro de poblaciones de levaduras en suelo rizosférico de páramos. Para este grupo se registraron valores de biomasa altos los cuales responden al efecto de la lluvia con una disminución en la biomasa de este grupo en la temporada de lluvia en un 6.3% y 35.3% en Santa Inés y Urrao respectivamente. Así mismo se observó una disminución en el índice de diversidad en ambos sitios siendo mucho más marcado el cambio en Urrao a causa de la ausencia de uno de los morfotipos reportado en sequía. La significativa abundancia de levaduras en estos suelos puede estar vinculada al porcentaje de carbono y nitrógeno debido a que su densidad poblacional esta directamente correlacionada con estos nutrientes (Moawad et al. 1986) y a las múltiples adaptaciones que presentan algunas especies a los ambientes fríos (Thomas-Hall et al. 2010).

La mayor diferencia en las poblaciones bacterianas funcionales se observó en las biomásas de las bacterias solubilizadoras de fosfatos y fijadoras de nitrógeno, las cuales son 1.23 y 1.29 veces mayores en Santa Inés. La mayor abundancia de bacterias fosfato solubilizadoras en Santa Inés podría ser explicada por el efecto de las altas concentraciones de fósforo en Urrao ya que como lo mostraron Mander et al. 2012, la incidencia de estas poblaciones es mayor en suelos con bajos contenidos de fósforo.

Las poblaciones estudiadas con potencial para fijar nitrógeno tipo *Rhizobium*, se presentaron en el suelo rizosférico de ambos páramos, siendo mayor su biomasa en el páramo de Santa Inés, fenómeno que podría explicarse por el contenido de nitrógeno en ambos suelos, ya que bajos contenidos favorecen el proceso de fijación (Atlas y Bartha 1997) lo que puede ocurrir en cepas de *Rhizobium* de vida libre (Luwing 1984).

Los hongos aislados en este estudio con potencial celulolítico corresponden al 62.5% en Santa Inés y 65% en Urrao, lo que indica, que en los dos páramos hay un potencial degradador de celulosa, pero de acuerdo con los índices obtenidos la actividad celulolítica de estos hongos no es muy significativa (entre 2.21 y 1.03). Los resultados podrían indicar que hongos rizosféricos de páramos no presentan una alta actividad descomponedora lo que junto con la temperatura explicarían las bajas tasas de degradación de la materia orgánica en estos ecosistemas, así también la baja proporción de hongos solubilizadores de fosfatos en estos suelos indica que su actividad no es muy significativa por lo que puede presumirse que es la comunidad bacteriana la que disponibiliza este nutriente para las plantas.

El análisis NMDS mostró que en conjunto las variables climáticas, los parámetros fisicoquímicos y las biomásas de los grupos microbianos permiten diferenciar los páramos estudiados corroborando la hipótesis de aislamiento geográfico. Además, se observó un distanciamiento en las temporadas de lluvia y sequía para cada páramo, indicando que los factores climáticos afectan la dinámica del suelo.

8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las condiciones climáticas de cada páramo fueron diferentes, así como también se observaron cambios conforme a las temporadas de lluvia y sequía, de modo que un incremento en la humedad relativa es el factor ambiental que define la temporada de lluvia.

Los parámetros fisicoquímicos del suelo rizosférico de *Espeletia* sp. fueron diferentes para los dos sitios de estudio, el páramo de Urrao mostró valores muy elevados en los macronutrientes.

La biomasa total de microbiota rizosférica de *Espeletia* sp. en los páramos de Santa Inés y Urrao es muy similar, sin embargo, los grupos evaluados se distribuyen diferencialmente.

Las poblaciones microbianas son dinámicas y sufrieron cambios conforme a las temporadas climáticas, aunque no se puede establecer un patrón para dichos cambios.

En ambos páramos la microbiota presenta potencial para participar en procesos como la fijación de nitrógeno atmosférico, la solubilización de fosfato inorgánico y la degradación de celulosa, interviniendo en los ciclos biogeoquímicos.

Con el fin de dilucidar la interacción entre las variables ambientales, fisicoquímicas y microbiológicas es necesario hacer un seguimiento a largo plazo.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arias E y Piñeros P. 2008. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los Páramos de Guasca y Cruz Verde. [Tesis de pregrado]. [Bogotá (Colombia)]: Pontificia Universidad Javeriana. p. 204.

Atlas R y Bartha R. 1997. Microbial ecology: fundamentals and applications. Cuarta edición. Adison Wesley Longman. California, Estados Unidos.

Bardgett RD y McAlister E. 1999. The measurement of soil fungal:bacterial biomass ratios as an indicator of ecosystem self-regulation in temperate meadow grasslands. *Biology and fertility of soils* 29:282–290.

Barua S, Tripathi S, Chakraborty A, Ghosh S y Chakrabarti K. 2011. Studies on non-symbiotic diazotrophic bacterial populations of coastal arable saline soils of India. *Indian Journal of microbiology* 53(1):369-376.

Benavides GD y Hermida AM. 2008. Aislamiento e identificación de flora bacteriana nativa de los páramos Cruz Verde y Guasca (Cundinamarca). [Tesis de pregrado]. [Bogotá (Colombia)]: Pontificia Universidad Javeriana. p. 118.

- Bernal E, Celis S, Galindez X, Moratto CJ y Garcia D.** 2006. Microflora cultivable y endomicorrizas obtenidas en hojarasca de bosque (Páramo Guerrero - Finca Puente de Tierra) Zipaquirá, Colombia. [Tesis]. [Bogotá (Colombia)]: Universidad Nacional de Colombia.
- Bobadilla C y Rincón S.** 2008. Aislamiento y evaluación de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos plaza. [Tesis de pregrado]. [Bogotá (Colombia)]: Pontificia Universidad Javeriana. p. 97.
- Botha A.** 2010. The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil biology and biochemistry* 43(1):1-8.
- Brandes-Ammann A, Kölle L y Brandl H.** 2011. Detection of bacterial endospores in soil by terbium fluorescence. *International Journal of microbiology* 2011:1-5.
- Chitiva A, Torrenegra R, Cabrera C, Díaz N y Pineda V.** 2007. Contribución al estudio de microhongos filamentosos en los ecosistemas Páramo de Guasca y El Tablazo. Estudio preliminar de mohos de páramos colombianos. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.
- Chu H, Fierer N, Lauber CL, Caporaso J, Knight R y Grogan P.** 2010. Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. *Environmental microbiology* 12(11):2998-3006.
- Cruz-Martínez K, Suttle KB, Brodie EL, Power ME, Andersen GL y Banfield JF.** 2009. Despite strong seasonal responses, soil microbial consortia are more resilient to long-term changes in rainfall than overlying grassland. *ISME journal* 3:738-744.
- Cuatrecasas J.** 1958. Aspectos de la vegetación natural de Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas Físicas y Naturales* 10(40):221-268.
- Das K y Mukherjee A.** 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource technology* 98(7):1339-1345.
- Deak T y Beuchat LR.** 1996. Handbook of food spoilage yeasts. Boca Raton, Florida. CRC Press. p 210.
- Díaz-Granados M, Navarrete J y Suárez T.** 2005. Páramos hidrosistemas sensibles. *Revista de Ingeniería UniAndes* 22:64-75.
- Faoro H, Alves AC, Souza EM, Rigo LU, Cruz LM, Al-Janabi SM, Monteiro RA, Baura VA y Pedrosa FO.** 2010. Influence of soil characteristics on the diversity of bacteria in the Southern Brazilian Atlantic forest. *Applied and Environmental Microbiology* 76(14):4744-4749.
- Fierer N y Jackson R.** 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *PNAS* 103(3): 626-631.
- Fierer N, Lauber C, Ramirez K, Zaneveld J, Bradford N Knight R.** 2012. Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *ISME journal* 6:1007-1017.
- Flórez P, Krabbe N, Castaño J, Suárez G y Arango JD.** 2004. Evaluación avifauna del Páramo de Frontino, Antioquia. Colombia. *Fundación ProAves Reporte* 6(27).

- Fonseca YA, Castellanos DE y León TE.** 2011. Efecto antagónico *in vitro* de Actinomicetos aislados de purines de Chipaca (*Bidens pilosa* L.) frente a *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. *Revista Facultad Nacional de Agronomía* 64(2):6111-6119.
- Gaitán D y Pérez L.** 2007. Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). [Tesis de pregrado]. [Bogotá (Colombia)]: Pontificia Universidad Javeriana. p. 114.
- Graff A y Conrad L.** 2005. Impact of flooding on soil bacterial communities associated with poplar (*Populus* sp.) trees. *FEMS Microbiology Ecology* 53:401-415.
- Henderson A, Churchill S y Luteyn JL.** 1991. Neotropical plant diversity. *Nature* 351:21-22.
- Hofstede R, Segarra P y Mena-Vásquez P,** Editores. 2003. Los páramos del mundo. Proyecto Atlas Mundial de Páramos. Global Peatland Initiative, Ecuador.
- Holding AJ.** 1960. The properties and classification of the predominant Gram-negative bacteria occurring in soil. *Journal of applied bacteriology* 23:515-525.
- Hooghiemstra H y Van der Hammen T.** 2004. Quaternary Ice-Age dynamics in the Colombian Andes: developing an understanding of our legacy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 359(1442):173-181.
- Howard RL, Abotsi E, Jansen van Rensburg EL y Howard S.** 2003. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology* 2(12):602-619.
- Idriss E, Makarewicz O, Farouk A, Rosner K, Greiner R, Bochow H, Richter T y Borriss R.** 2002. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology* 148:2097-2109.
- Jenkins S, Waite I, Blackburn A, Husband R, Rushton S y O'Donnell.** 2010. Actinobacterial community dynamics in long term managed grasslands. 19 World congress of soil science, soil solutions for a changing world. Brisbane, Australia.
- Jones R, Robeson MS, Lauber CH, Hamady M, Knight R y Fierer N.** 2009. A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. *ISME journal* 3:442-453.
- Kasana R, Salwan R, Dhar H, Dutt S y Gulati A.** 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. *Current microbiology* 57(5):503-507.
- Khan A, Jilani G, Akhtar MS, Saqlan SM y Rasheed M.** 2009. Phosphorus Solubilizing Bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *Journal of Agriculture and Biological Sciences* 1(1):48-58.
- Kim Won-Il, Won Kyong Cho, Su-Nam Kim, Hyosub Chu, Kyoung-Yul Ryu, Jong-Chul Yun, y Chang-Seuk Park.** 2011. Genetic diversity of cultivable Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 21(8):777-790.
- Kloepper J, Ryu CM y Zhang.** 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94(11):1259-1256.

Koch AL, editor. 1994. Growth measurement. En: Gerhardt P. Methodology for general and molecular bacteriology. Washington, 248 pp.**Landesman WJ y Dighton J**. 2011. Shifts in microbial biomass and the bacteria: fungi ratio occur under field conditions within 3 h after rainfall. *Soil microbiology* 62:228-236.

Luwing RA. 1984. *Rhizobium* free-living nitrogen fixation occurs in specialized nongrowing cells. *PNAS* 81(5):1566-1569.

Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV y Clark DP. 2010. Biology of microorganisms. Doceava edición. Person Education SA. Estados Unidos.

Mander C, Wakelin S, Young S, Condrón L y O'Callaghan M. 2012. Incidence and diversity of phosphate-solubilising bacteria are linked to phosphorus status in grassland soils. *Soil biology and biochemistry* 44(1):93-101.

Mays-Figueroa J. 2004. Fijación biológica de nitrógeno. *Revista UDO Agrícola* 4(1):1-20.

Mittermeier RA, Robles GP y Goettsch MC. 1997. Megadiversidad: los países biológicamente más ricos del mundo. Cemex y Agrupación Sierra Madre SC. México.

Moawad H, Salem SH, Badr El-Din SMS, Khater T y Iskandar M. 1986. Yeasts in soils of Egypt. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 141:431-435.

Montaña JS, Jimenez DJ, Hernández M, Ángel T y Baena S. 2011. Taxonomic and functional assignment of cloned sequences from high Andean forest soil metagenome. *Antonie van Leeuwenhoek* 101:205-215.

Morales M, Otero J, Van der Hammen T, Torres A, Cadena C, Pedraza C, Rodríguez N, Franco C, Betancourth JC, Olaya E, Posada E y Cárdenas L. 2007. Atlas de páramos de Colombia. Bogotá DC: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. p 208.

Moratto C, Martínez LJ, Valencia H y Sánchez J. 2005. Efecto del uso del suelo sobre hongos solubilizadores de fosfato y bacterias diazotróficas en el páramo de Guerrero (Cundinamarca). *Agronomía colombiana* 23(2):299-309.

Myung Y, Kim M, Lee-Cruz L, Lai-Hoe A, Go R, Ainuddin N, Abdul Rahim R, Shukor N, Adams J. 2012. Distinctive bacterial communities in the rhizosphere of four tropical tree species. *Microbial ecology* 64(4):1018-1027.

Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietramellara G, Renella G y Valeri F. 2008. Effects of root exudates in microbial diversity and activity in rhizosphere soils. En: Nautiyal C y Dion P. Molecular mechanisms of plant and microbe coexistence. Springer. p. 339-365.

Noori MSS y Saud HM. 2012. Potential plant growth-promoting activity of *Pseudomonas* sp isolated from paddy soil in Malaysia as biocontrol agent. *Journal of plant pathology and microbiology* 3(2):1-4.

Páramo ecosystem [Internet]. 1999. Missouri botanical garden. Fecha de acceso: 2013 enero 28. Disponible en: <http://www.mobot.org/mobot/research/páramo_ecosystem/introduction.shtml>

Patiño CO. 2010. Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del Valle del Cauca. Estudio de biodiversidad y eficiencia [Tesis de doctorado]. [Palmira (Colombia)]: Universidad Nacional de Colombia. p. 133.

- Phitsuwan P, Laohakunjit N, Kerdchoechuen O, Kyu KL y Ratanakhanokchai K.** 2012. Present and potential applications of cellulases in agriculture, biotechnology, and bioenergy. *Folia microbiologica* DOI 10.1007/s12223-012-0184-8.
- Pini F, Frascella A, Santopolo L, Bazzicalupo M, Biondi E, Scotti C y Mengoni A.** 2012. Exploring the plant-associated bacterial communities in *Medicago sativa* L. *BCM microbiology* 12(78):1471-1480.
- Pini F, Galardini M, Bazzicalupo M y Mengoni A.** 2011. Plant-Bacteria association and symbiosis: are there common genomic traits in Alphaproteobacteria?. *Genes* 2:1017-1032.
- Pourcher AM, Sutra L, Hébe I, Moguedet G, Bollet C, Simoneau P y Gardan L.** 2001. Enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from refuse of a landfill. *FEMS Microbiology Ecology* 34:229-241.
- Qi X, Wang E, Xing M, Zhao W, Chen X.** 2012. Rhizosphere and non-rhizosphere bacterial community composition of the wild medicinal plant *Rumex patientia*. *World journal of microbiology and biotechnology* 28(5):2257-2265.
- Rawat S, Männistö M, Bromberg Y y Häggblom M.** 2012. Comparative genomic and physiological analysis provides insights into the role of Acidobacteria in organic carbon utilization in Arctic tundra soils. *FEMS microbiology ecology* 1-15.
- Resendis-Antonio O, Reed JL, Encarnación S, Collado-Vides J, Palsson BØ.** 2007. Metabolic reconstruction and modeling of nitrogen fixation in *Rhizobium etli*. *PLoS Comput Biol* 3(10): e192.
- Richardson A, Barea JM, McNeill A y Prigent-Combaret C.** 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant soil* 321:305-339.
- Ritz K y Young IM.** 2004. Interactions between soil structure and fungi. *Mycologist* 8(2):52-59.
- Rivera R, Torres D y Montes S.** 2001. Páramos de Colombia. Banco de Occidente. Cali, Colombia.
- Roesch L, Olivares F, Pereira L, Selbach P, Saccol de Sá E y Oliveira de Camargo F.** 2006. Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22:967-974.
- Sessitsch A, Weilharter A, Gerzabek M, Kirchmann H y Kandeler E.** 2001. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Applied and Environmental Microbiology* 67:4215-4224.
- Sorensen J y Sessitsch A.** 2007. Plant associated bacteria-Lifestyle and molecular interactions. En: van Elsas JD, Jansson JK y Trevors J, editores. *Modern soil microbial ecology*. Segunda edición. CRC Press. p 211-236.
- Strickland MS y Rousk J.** 2010. Considering fungal:bacterial dominance in soils. methods, controls, and ecosystem implications. *Soil biology and biochemistry* 42(9):1385-1395.
- Talia P, Sede SM, Campos E, Rorig M, Principi D, Tosto D, Hopp HE, Grasso D y Cataldi A.** 2011. Biodiversity characterization of cellulolytic bacteria present on native Chaco soil by comparison of ribosomal RNA genes. *Research in Microbiology* 163:221-232.

Thomas-Hall SR, Turchetti B, Buzzini P, Branda E, Boekhout T, Theelen B y Watson K. 2010. Cold-adapted yeasts from Antarctica and the Italian Alps-description of three novel species: *Mrakia robertii* sp. nov., *Mrakia blollopis* sp. nov. and *Mrakiella niccombsii* sp. nov. *Extremophiles* 14(1):47-59.

Unger IM, Kennedy AC y Muzika RM. 2009. Flooding effects on soil microbial communities. *Applied soil ecology* 49:1-8.

Uren NC. 2007. Types, amounts, and possible function of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. En: Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P, editores. *The rhizosphere biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. Marcel Dekker, New York. p 1-21.

Yurkov AM, Kemler M y Begerow D. 2012. Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. *Fungal ecology* 5(1):24-35.