

**DIVERSIDAD DE BACTERIAS ENDÓFITAS CON CAPACIDAD DE SOLUBILIZAR FOSFATO, ASOCIADAS A DOS ESPECIES DEL GÉNERO *Tillandsia* EN BOSQUE SECO TROPICAL, CORREGIMIENTO LAS PALOMAS, MONTERÍA-CÓRDOBA.**

**Lina María García Marín<sup>1</sup>**

**Orfa Inés Contreras Martínez, MSc<sup>2</sup> Juan Carlos Linares Arias MSc<sup>2</sup>**

**1. Estudiante, Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Biología, Universidad de Córdoba, Montería – Colombia.**

**2. Docente investigador Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Córdoba, Montería – Colombia.**

**Correspondencia: lgarciamarin@correo.unicordoba.edu.co**

**Resumen.**

La familia Bromeliaceae es un grupo de plantas que juegan un papel importante en los ecosistemas tropicales, ya que estas despliegan mecanismos novedosos para sobrellevar la sequía y la obtención de nutrientes sin tomarlos del forófito, tal especialización requiere de la asociación con microorganismos endófitos que suministran elementos esenciales como el fósforo. El objetivo de esta investigación fue evaluar la diversidad de bacterias endófitas con capacidad de solubilizar fósforo asociadas a las especies *Tillandsia elongata* Kunt. y *Tillandsia flexuosa* SW. T de un fragmento de bosque seco tropical (bs-T) Las Palomas, Montería - Córdoba. Para ello se obtuvieron bacterias endófitas de hojas y raíces, donde la densidad poblacional varió entre  $0,08 \times 10^{-5}$  y  $0,71 \times 10^{-2}$  UFC/mL a las que se les evaluó *in vitro* la capacidad de solubilizar fósforo sembrándolas en un medio rico en fósforo tricálcico (NBRIP). Los resultados de la actividad *in vitro* de la solubilización de fósforo mostraron que de los 48 morfogrupos aislados, 17 presentaron esta actividad solubilizadora, en los que se encontraron bacterias Gram positivas y Gram negativas, alguno de estos pertenecientes a los géneros; *Klebsiella*, *Shigella* y *Bacillus*, además se encontraron 7 morfotipos de hongos endófitos y 3 de ellos fueron capaces de solubilizar fósforo. Estos resultados proponen que las especies *T. elongata* y *T. flexuosa*, presentes en bs-T contienen microorganismos endófitos dentro de sus tejidos con capacidad de brindarles factores de crecimiento como el fósforo.

**Palabras claves:** Endófitos, Epifitas, Factores de crecimiento vegetal, Bromelias.

## INTRODUCCIÓN.

A nivel mundial el bosque seco tropical es considerado como un ecosistema con prioridad para la conservación, por sus altos grados de endemismo y especiación, así como también por estar ubicado en zonas con presiones antrópicas elevadas. En la actualidad, Colombia posee solo el 1.5% de la cobertura original del bosque seco tropical del país (1), convirtiéndose así en uno de los 3 ecosistemas más degradados, fragmentados y menos conocidos, la destrucción continua del mismo coloca a las especies que conforman estos ecosistemas bajo gran presión por el debilitamiento y pérdida de hábitat, en donde un componente biótico importante de estos bosques son las epífitas vasculares (2), como las pertenecientes a la familia Bromeliaceae, que son un grupo de plantas que en Colombia cuentan con alrededor de 22 géneros representados por cerca de 500 especies (3), de las cuales el 60% presentan hábito epífita por lo cual tienen un gran valor ecosistémico ya que cumplen un papel importante en la dinámica de nutrientes y aumentan la eficiencia en la toma de agua de los forófitos (4), no obstante debido a la contaminación ambiental

sobreexplotación, disminución y fragmentación de hábitats, por las diferentes acciones antrópicas (5,6), las epífitas se encuentran en constante amenaza por depender estructuralmente del forófito.

Al estas conformar significativamente la flora del bosque seco (6) su riqueza y abundancia en estos ecosistemas tan disturbados presentan un gran declive, en el caribe colombiano podemos encontrar especies amenazadas de la familia Bromeliaceae pertenecientes al género *Tillandsia* (5), debido a que no poseen una superficie terrestre la obtención de nutrientes se realiza por la asociación con microorganismos que suministran elementos esenciales para el crecimiento y desarrollo vegetal (7), entre estos microorganismos podemos encontrar a las bacterias endófitas que ejercen un papel crucial en las plantas (8), estas no solo promueven el crecimiento en las plantas hospederas (9) sino que también aumentan la resistencia a enfermedades (10), contribuyen a la fijación biológica de nitrógeno (11), solubilizan el fosfato (12).

Entre los elementos más limitantes para el crecimiento de las plantas después del nitrógeno está el fosforo, debido a su gran

insolubilidad, para que pueda ser asimilado se necesita de la producción de ácidos orgánicos que permiten la acidificación del medio facilitando la absorción de este elemento, estos al presentar carga negativa forman complejos al quelar los iones metálicos como el  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$  y  $\text{Al}^{+3}$  que se encuentran asociados con fósforo insoluble y se transforman en fósforo soluble para la planta.(12,13)

Las bacterias mediante reacciones químicas son capaces de convertir el fosfato tricálcico  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  en fosfato di y monobásico asimilables para las plantas. Muchas bacterias utilizan la ruta metabólica de la glucosa para la producción de estos ácidos, provocando la liberación del fósforo al medio (13). Además, en condiciones específicas como la disponibilidad de materia orgánica, estiércol, residuos vegetales, se estimula la producción de enzimas fosfatasas, ya que estos componentes protegen las enzimas y persisten por largos periodos de tiempo, sin embargo, los cambios bruscos en el pH pueden llegar a desnaturalizarlas e inactivarlas (14).

En los últimos años los estudios realizados de bacterias endófitas han sido enfocados

a plantas de interés comercial, como lo es el pasto, azafrán, arroz, café, especies maderables, entre otros (15). La información sobre la diversidad funcional de bacterias endófitas asociadas a las bromelias y como estas pueden intervenir en el desarrollo y respuesta de las plantas frente a las diversas condiciones desfavorables que se presentan en estos ecosistemas es insuficiente, conociendo la importancia de las bacterias endófitas asociadas a las plantas del genero *Tillandsia*, el objetivo de esta investigación fue evaluar la diversidad de bacterias endófitas con capacidad de solubilizar fosfato asociadas a las especies *Tillandsia elongata* Kunt. y *Tillandsia flexuosa* SW. T en bosque seco tropical, Corregimiento Las Palomas, Montería-Córdoba.

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

Esta investigación es de tipo experimental y se realizó en dos fases, una de campo y una de laboratorio, para la segunda fase se realizó el aislamiento de las muestras, así como también los ensayos *in vitro* de la capacidad solubilizadora de fosfato de los aislados.

## Fase de campo.

Se llevó a cabo la identificación del sitio de muestreo y la recolección del material vegetal.

## Identificación del sitio de muestreo.

La selección del sitio de muestreo se realizó mediante la observación, en búsqueda de especies del género *Tillandsia* en un fragmento de bs-T, ubicado en la finca Palmeras en el corregimiento Las Palomas, Montería Córdoba, a N 08° 31' 32.3" y W 076° 05' 48,5". Con una temperatura promedio de

27° C y una precipitación anual promedio de 1200 mm. (Figura 1).

## Muestreo.

Se realizó un muestreo aleatorio, en época seca, en tres arboles pertenecientes a la familia Meliaceae, los cuales se ubicaban en el borde del fragmento; en cada sitio con ayuda de un baja ramas se recolectaron seis plantas completas divididos en tres estratos verticales (Dosel alto, dosel medio y tronco) en cada uno de los estratos se tomó un individuo de la especie *Tillandsia elongata* Kunth y *Tillandsia flexuosa* Sw.

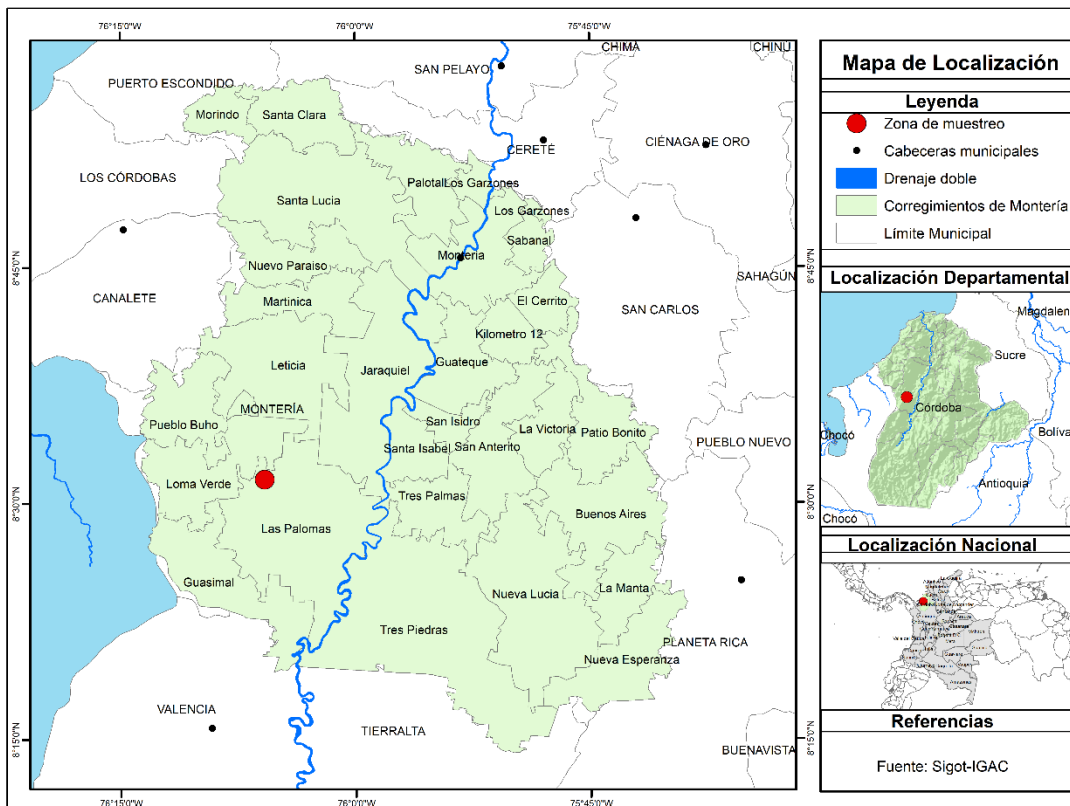


Figura 1. Zona de muestreo.

Con relación a la posición en el forófito las plantas pertenecientes a ambas especies que se tomaron en el tronco se encontraban a una altura promedio de 2 metros, mientras que las que se encontraban en el dosel medio y superior se tomaron a una altura media de 4 y 6 metros respectivamente. Para la selección de los individuos se tuvo en cuenta que las plantas se encontraran en estadio adulto, en buen estado y que no presentaran ningún signo de enfermedad. Se obtuvo un total de 18 individuos en los tres árboles, nueve pertenecientes a la especie *T. elongata* y nueve pertenecientes a la especie *T. flexuosa*, además se realizó la toma de dos individuos de forma aleatoria, uno de cada especie para su posterior identificación.

Las muestras obtenidas se almacenaron y etiquetaron por su posición en el dosel, forófito y especie a la que pertenecía, fueron transportadas al laboratorio de Microbiología de la Universidad de Córdoba para el aislamiento e identificación de bacterias endófitas, de igual manera se realizó la identificación taxonómica del material vegetal recolectado en el herbario de la Universidad de Córdoba.

### **Fase de laboratorio.**

Se realizó el aislamiento de bacterias endófitas utilizando la metodología propuesta por Chaudhry *et al.*, 2016 (16) a las que se evaluó la capacidad de solubilizar fosfato *in vitro*, sembrándolas en medio NBRIP, siguiendo la metodología propuesta por Nautiyal en 1999 (17), para la identificación de los aislados se realizó según protocolo propuesto por Álvarez *et al.*, 2014 (18).

### **Aislamiento de bacterias endófitas.**

Las plantas colectadas fueron sometidas a un proceso de desinfección superficial. Hojas y raíces fueron cortadas de cada planta, se tomó 7gr de hoja y 1 gr de raíz, para cada tejido se realizó la desinfección superficial con base en la metodología propuesta por Chaudhry *et al.*, 2016 (16), las muestras vegetales fueron limpiadas con agua, seguidamente se lavaron tres veces con agua destilada estéril, luego fueron sumergidas y agitadas en alcohol al 70%. Posteriormente, se sumergieron en hipoclorito de sodio al 5,25% con una gota de tween 80, por último, se lavaron tres veces con agua destilada estéril, para confirmar la efectividad de la desinfección superficial, se tomó una alícuota del último lavado de cada una de las muestras y se

sembró en el agar R2A, fue incubado a 28°C por 72 horas. La efectividad de la desinfección se evidenció por la ausencia de microorganismos en las cajas de Petri.

A partir de la desinfección superficial efectiva, cada tejido fue colocado en un plato de porcelana y macerado con nitrógeno líquido hasta obtener una mezcla homogénea, posteriormente de cada homogeneizado se realizaron diluciones seriadas con base 10 ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ) que fueron sembradas en R2A por el método de difusión en superficie por duplicado en cajas de Petri utilizando el medio R<sub>2</sub>A e incubadas a 28°C por 72 horas. La densidad poblacional de bacterias por tejido se estimó por conteo directo de unidades formadoras de colonias (UFC/ml), se observaron y seleccionaron colonias a partir de características como color, forma, borde, elevación y tamaño.

Los morfotipos se purificaron en agar R2A para su posterior evaluación *in vitro* de la capacidad solubilizadora de fosfato.

#### **Evaluación *in vitro* de capacidad de solubilización de fosfato.**

Se realizó una evaluación cualitativa de solubilización de fosfato siguiendo la metodología propuesta por Nautiyal, 1990

(17) cada aislado fue sembrado por punción e incubado en medio NBRIP sólido compuesto por: Glucosa,  $\text{Ca}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , KCl,  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  y agar. Cada morfotipo se sembró e incubó durante 7 días a 28°C. La capacidad de solubilizar fosfatos se determinó por la formación de halo transparente visible alrededor y debajo de la colonia. El parámetro que se tuvo en cuenta para seleccionar las cepas con capacidad solubilizadora, fue el índice de solubilización (IS) (suma diámetro de la colonia y el halo dividido por el diámetro de la colonia).

Todos los ensayos se hicieron por duplicado.

#### **Identificación de los aislados con capacidad de solubilizar fosfato.**

Para la identificación de aislados de bacterias endófitas con actividad positiva para la solubilización de fosfato se realizó tinción de Gram, tinción de esporas, pruebas bioquímicas, como reacción en medios TSI (Triple Azúcar Hierro), Lisina- 7 hierro, SIM, Citrato de Simmons, catalasa, oxidasa, agar Cetrimide y el kit API 20 E (Biomérieux).

## RESULTADOS.

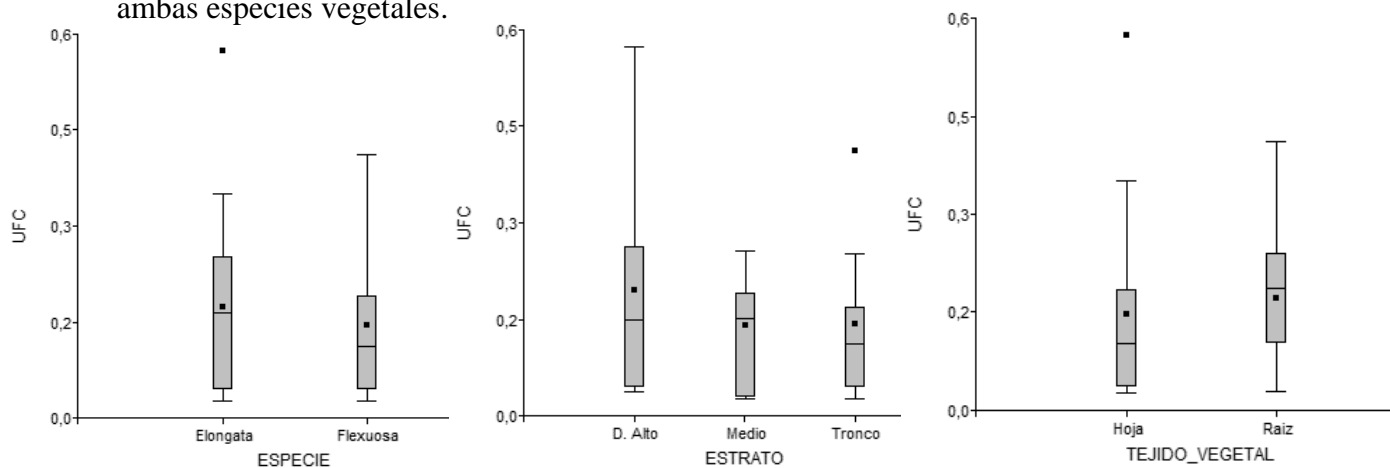
### Aislamientos obtenidos y densidad poblacional

Se obtuvieron 378 microorganismos endófitos aislados de las especies *T. elongata* y *T. flexuosa*, los cuales fueron agrupados en 48 morfogrupos de bacterias endófitas. Los aislados se nombraron de acuerdo a su ubicación en los diferentes estratos del forófito, la especie y el tejido vegetal al que pertenecían acompañado de un número.

La densidad poblacional de los microorganismos endófitos varió entre  $0,08 \times 10^{-5}$  y  $0,71 \times 10^{-2}$  UFC/mL donde en las hojas de la especie *T. flexuosa* se observó una menor densidad poblacional en relación a las hojas de la especie *T. elongata*, no obstante, las raíces de *T. elongata* presentaron una densidad poblacional mayor a la de las hojas en ambas especies vegetales.

Con respecto a la ubicación de la planta en el forófito, la densidad poblacional fue muy similar en los tres estratos, se destaca que la mayor densidad poblacional se encontró en las plantas ubicadas en el dosel alto y dosel medio. (Figura 2).

La prueba de Shapiro.Wilk, arroja un p-valor= $0.8485 > 0.05$ , lo que indica que con una confianza del 95% los residuales siguen una distribución normal, es decir que la densidad de microorganismos endófitos se comportan de manera normal en los diferentes estratos evaluados, de igual forma la prueba de Levene, arroja un p-valor= $0.7437 > 0.05$ , lo que indica que con una confianza del 95% las varianzas son homogéneas.



**Figura 2.** Densidad poblacional de microorganismos endófitos aislados de la especie *T. elongata* y *T. flexuosa*.

	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>GI</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Estrato	0,02	2	0,01	0,75	0,4839
Especie	0,01	1	0,01	0,49	0,4902
Tejido Vegetal	$4,1 \times 10^{-3}$	1	$4,1 \times 10^{-3}$	0,31	0,5816
Estrato: Especie	$4,2 \times 10^{-3}$	2	$2,1 \times 10^{-3}$	0,16	0,8553
Estrato: Tejido vegetal	0,06	2	0,03	2,42	0,1106
Especie: Tejido Vegetal	$1,8 \times 10^{-3}$	1	$1,8 \times 10^{-3}$	0,14	0,7145
Estrato: Especie: Tejido Vegetal	0,03	2	0,02	0,16	0,3308
Error					
Total	0,45		35		
*Confianza del 95%					

Tabla 1. Análisis multifactorial de densidad poblacional (UFC) de bacterias endófitas en función a la posición de la planta en el forófito, la especie de la planta y el tejido vegetal.

El análisis multifactorial no encontró relaciones estadísticamente significativa entre la densidad poblacional (UFC/mL) en función a la posición de la planta en el forófito, la especie de la planta y el tejido vegetal (Tabla 1), lo que sugiere que no existen diferencias entre la densidad poblacional de los microorganismos endófitos y las diferentes variables evaluadas.

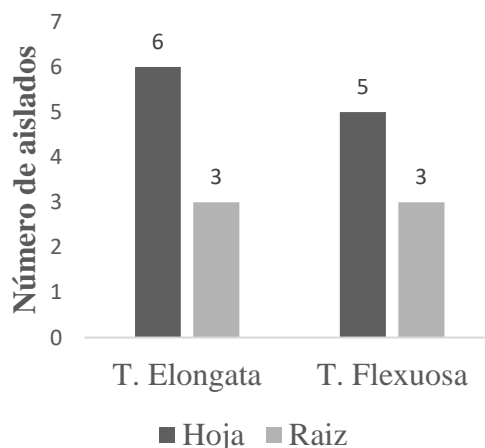


### Actividad in vitro de la capacidad de solubilizar fosfato.

Los resultados de la actividad *in vitro* de la solubilización de fosfato mostraron que de los 48 morfogrupos aislados, 17 presentaron esta actividad, en donde la mayoría correspondieron a bacterias Gram-negativas (n=9/17), mientras que los números menores se ubicaron dentro del de bacterias Gram-positivas (8/17). Estas y otros morfogrupos no identificados, fueron aisladas de las dos especies estudiadas, las cuales presentaron una diversidad similar, puesto que se halló una riqueza de 9 morfotipos en la especie *T. elongata* y 8 morfotipos en *T. flexuosa* (Figura 3.)

Entre los microorganismos obtenidos se encontraron 7 morfotipos de hongos endófitos y 3 de esos morfotipos fueron capaces de solubilizar fosfato.

La determinación de la capacidad de solubilización y la selección semicuantitativa de los microorganismos con capacidad solubilizadora de fosfato, se realizó basándose por presencia de halos de solubilización y en el índice de solubilización (IS) hallado en medio sólido NBRIP (Tabla 2). De este modo las bacterias endófitas aisladas presentaron un índice de solubilización (IS) entre 23 y 1,3 considerado aceptable para un microorganismo fosfato solubilizador según Otalora *et al.*, en 2003(19).



**Figura 3.** Número de bacterias endófitas con capacidad de solubilizar fosfato de acuerdo al tejido del que se aislaron.

<b>Morfogrupo</b>	<b>IS</b>
<b>M2</b>	<b>2,40</b>
<b>M6</b>	<b>2,25</b>
<b>M18</b>	<b>3,29</b>
<b>M19</b>	<b>3,30</b>
<b>M20</b>	<b>3,27</b>
<b>M24</b>	<b>3,30</b>
<b>M26</b>	<b>3,55</b>
<b>M29</b>	<b>2,32</b>
<b>M31</b>	<b>3,17</b>
<b>M33</b>	<b>2,29</b>
<b>M35</b>	<b>2,32</b>
<b>M38</b>	<b>3,33</b>
<b>M40</b>	<b>2,33</b>
<b>M41</b>	<b>1,13</b>
<b>M42</b>	<b>1,20</b>
<b>M47</b>	<b>6,60</b>
<b>M49</b>	<b>23,0</b>

**Tabla 2.** Índices solubilización de cada uno de los morfogrupos aislados.

Las colonias bacterianas obtenidas en el medio sólido NBRIP mostraron un color blancuzco, amarillento y verdoso algunas con color opaco transparente y de consistencia mucosa o gomoide.

Mediante observación microscópica se evidenció que el 38,8% fueron bacilos Gram-Negativos, el 27,7% cocos Gram-Positivos, el 22,2% cocos Gram-Negativos y el 11,1% cocobacilo, también encontramos bacterias fermentadoras y no fermentadoras, de igual forma se encontraron bacterias con capacidad de usar el citraro como única fuente de

carbono, se identificaron bacterias endófitas pertenecientes a los phylum proteobacterias, pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Shigella*, *Klebsiella*.

### **Discusión.**

#### **Aislamiento y densidad poblacional.**

En el presente estudio se evidencia la presencia de microorganismos endófitos asociados a la especie *T. elongata* y *T. flexuosa* estos pueden estar involucrados en el crecimiento vegetal potenciando el desarrollo de las plantas, proveyendo nutrientes para que estas puedan subsistir en ambientes donde la falta de los mismos es constante como en el bs-T. Actualmente esta información no había sido reportada para estas especies vegetales, y ha sido muy escasa en otras epifitas vasculares que se encuentran en bosques tropicales, según Montora- Barrios en 2015 las bacterias que residen en los tejidos internos de la planta, se piensa que son capaces de modular positivamente la fisiología de la planta huésped con mayor eficacia (20), aunque cabe resaltar que según Zhao *et al.*, en 2015 el conocimiento acerca de las comunidades de microorganismos endófitos que pueden estar presentes en estas epifitas vasculares es escaso, sin embargo la fisiología de las

plantas del género *Tillandsia* presentan una ventaja al estas poseer un gran número de estomas, además en su estudio establece que la superficie de las plantas (raíces, hojas y tallos) son las primeras zonas donde se albergan los microorganismos (21), que según Liu, *et al.*, en 2017 esto es un factor esencial para la entrada de los microorganismos que se encuentran en el exterior de la planta, esto representaría una superioridad en la capacidad de habitar en ambientes adversos para las bromelias. (7).

Los resultados estadísticos de la densidad poblacional de bacterias endófitas con respecto a su posición en el forófito no presentaron diferencias significativas lo que es interesante puesto que según Doty *et al.*, en 2016 la posición del material vegetal en el árbol puede ser un factor que defina la microbiota endófitas, por lo que se esperaría que la densidad poblacional cambiara según el estrato evaluado, teniendo en cuenta que las plantas estudiadas pueden preferir una posición u otra en el forófito, además de que factores como el medio ambiente, interacciones con otros microorganismos y la época (22), cabe resaltar que las muestras fueron tomadas en época seca, donde los forófitos desprenden sus hojas para soportar la

sequía (23), por lo tanto condiciones como intensidad de la luz y área foliar de los doseles fueron muy parecidas para las epifitas presentes.

Aunque no haya diferencias estadísticamente significativas, la densidad poblacional de microorganismos endófitos fue mayor en el dosel alto. Según Liu *et al.*, en 2017 las partes de la planta que estén en cercanía al suelo, por lo general pueden tener mayor número microorganismos (7) esto puede ser porque estas pueden formar depósitos de materia orgánica, suelo y agua, debido a lo anterior se puede inferir que las plantas que se encuentran en el dosel alto son las que se encuentran más alejadas del suelo y por ello la densidad poblacional de microorganismos endófitos debería ser menor a diferencia de los que están en el tronco y en el dosel medio.

De igual manera los microorganismos y la densidad poblacional de estos, no tuvieron diferencias significativas entre las especies, puesto que *T. elongata* y *T. flexuosa* comparten su hábitat, ambas se encuentran en el mismo forófito, muchas de ellas se encuentran juntas y comparten las mismas condiciones ambientales, lo que concuerda con la afirmación de Lamb *et al.*, en 1996 el cual dice que las mayores

densidades poblacionales de bacterias endófitas, dependen normalmente de las variaciones estacionales y geográficas, el tipo de tejido vegetal, además de la interacción con el hospedero. (24)

### **Actividad in vitro de la capacidad de solubilizar fosfato.**

En este estudio identificamos bacterias endófitas pertenecientes a los phylum proteobacterias, que la mayoría han sido reportados en diferentes estudios, tal es el caso de *Bacillus*, *Shigella*, *Klebsiella*.

Diversos investigadores como Chen *et al.*, Ivanova *et al.*, en 2006 han reportado la capacidad que tienen diferentes especies bacterianas para solubilizar compuestos fosfatados inorgánicos insolubles como el fosfato tricálcico, fosfato dicalcico, hidroxiapatita y roca fosfato, en donde se incluyen bacterias Gram negativas y Gram positivas. (25), (26)

Kuklinsky-Sobral *et al.*, en 2004 demostraron que bacterias endófitas pertenecientes a las familias Pseudomonaceae, Burkholderiaceae y Enterobacterias asociadas a plantas de soya, mostró que estas bacterias tienen la capacidad de producir ácido índol acético (IAA) y de solubilizar de fosfato *in vitro*. (27)

Badía *et al.*, en 2011, en su investigación resaltan que las bacterias grampositivas, que pertenecen al género *Bacillus*, se pueden encontrar distribuidas en diferentes tipos de ambientes como el suelo, plantas y ecosistemas de aguas dulce y marina. (28)

Según Angulo *et al.*, en 2014 este género ha demostrado capacidad para incrementar el crecimiento de las plantas. (29)

Varias investigaciones han demostrado la capacidad del género *Bacillus* como solubilizador de fosfato como las realizadas por Maheswar y Sathiyavani en 2012 (30).

En 2007 Caballero *et al.*, reportaron a especies del género *Shigella* aisladas a partir de suelos algodoneros en donde estas presentaron mayor actividad solubilizadora. (31)

Se destacan investigaciones a escala mundial en torno a microorganismos solubilizadores de fosfato aislados en distintos tipos de suelo. Chung *et al.* En 2005, a partir de muestras rizosféricas de varios cultivos incluyendo arroz, aislaron e identificaron grupos bacterianos que solubilizan fosfatos activamente *in vitro*, y lograron identificar aislados pertenecientes a los géneros *Enterobacter*, *Pantoea* y *Klebsiella*. (32)

Prada en 2013 señaló que de 57 aislados sólo diez mostraron mediante evaluaciones cualitativas y cuantitativas tener una actividad solubilizadora de fósforo significativamente alta y la presencia dominante de los ácidos oxálico, cítrico y glucónico. (33)

De igual manera, Goswami *et al.*, en 2014, encontraron que bacterias pertenecientes al género *Bacillus* e indicaron que es un eficiente microorganismo solubilizador de fosfato. (34)

En estudios realizados por Chye *et al.*, en 2013 sobre diversidad de bacterias asociadas a plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas de Malasia, identificaron especies dentro del género *Aeromonas* y *Pasteurella* como bacterias endófitas en esas especies vegetales. (35)

Por otro lado, la morfología de nuestros aislados bacterianos coinciden con la morfología que reportó Seña en 2018 mostró que el 57,7% de las bacterias fueron bacilos Gram negativos, el 34,6% fueron bacilos Gram positivos y el 7,7% cocos Gram positivos. De las bacterias Gram positivos el 66,7%. (36)

Según Leroy *et al.*, en 2016 las Bromelias han desarrollado una gran diversidad de adaptaciones funcionales que conducen a la existencia de numerosos modos

nutricionales, esto podría explicar la presencia de bacterias con capacidad de solubilizar fosfato en estos ecosistemas. (37)

Además de que el crecimiento de bacterias no solo ayuda a promover la adaptación de las plantas sino que contribuyen al rendimiento de la planta hospedera como lo menciona Burbano *et al.*, en 2016 que se han reportado bacterias endófitas en otras especies vegetales como el arroz, maíz, pepino, la soja y la papa; con rasgos promotores de crecimiento, aportándoles nutrientes y sustancias como el fosfato, el hierro, ácido indolacético, elementos importantes para la planta donde se hospedan. (38)

## CONCLUSIÓN

En el presente estudio se logró evidenciar la presencia de microorganismos endófitos pertenecientes a los géneros, *Bacillus*, *Shigella*, *Klebsiella* asociados a las especies *T. elongata* y *T. flexuosa*, con capacidad de solubilizar fosfato *in vitro*.

Existe diversidad de bacterias endófitas asociadas a las especies evaluadas en el fragmento de bs-T, que podrían estar jugando un papel fundamental en el desarrollo, crecimiento permanencia y supervivencia de estas plantas en estos

ecosistemas, además de aportar datos claves para la comprensión de las dinámicas ecosistémicas, que sirven de base para estudios futuros.

### **Agradecimientos**

Este trabajo se desarrolló en el marco del proyecto Diversidad funcional en fragmentos de bs-T del departamento de Córdoba: bases para la conservación y manejo de un ecosistema amenazado, agradezco por el financiamiento de este trabajo, a mis directores por su tiempo y dedicación, a los jurados por sus correcciones, observaciones y aportes a este trabajo.

### **Bibliografía**

1. Instituto de Investigaciones de Recursos Biológicos “Alexander von Humboldt”, 2014 Memoria técnica para la verificación en campo del mapa de bosque seco tropical en Colombia. Escala 1:100.000.
2. Einzman H, Zotz G. 2016 How diverse are epiphyte assemblages in plantations and secondary forest in tropical lowlands? *Trop Conserv Sci.*; 9 (2): 629-647

3. Betancur Julio, García Castro Néstor Julio, Fernández Alonso J.Luis, Hernández Alexandra, 2006, Libro Rojo de Plantas de Colombia. Volumen 3 Las bromelias, las labiadas y las pasifloras, Instituto de Investigaciones de Recursos Biológicos “Alexander von Humboldt”.
4. Benzing , D. H. 1990. Vascular epiphytes. General biology and related biota. Cambridge University Press. New York.
5. Turner, I.M. 1996. Species loss in fragments of tropical rain forest: a review of the evidence. *Journal of Applied Ecology* 33: 200-205
6. Krömer T, Garcia J, Toledo T. 2014 Epífitas vasculares como bioindicadoras de la calidad forestal: impacto antrópico sobre su diversidad y composición. en: Gonzáles C, Vallerino A, Pérez J, Low P. Edición. *Bioindicadores: guardianes de nuestro futuro ambiental*. México: INECC; 605-623.
7. Liu H, Zhang L, Meng A2017. Isolation and molecular

- identification of endophytic diazotrophs from sedes and stems of three cereal crops. Unver T, ed, Plos ONE..
8. Sessitsch, A., B. Reiter, U. Pfeifer, y E. Wilhelm. 2002. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytic in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. FEMS Microbiol
  9. Tsavkelova, E., T. Cherdyntseva, S. Botina, y A. Netrusov. 2007. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. Microbiol.
  10. Chanway, C.P. 1998. Bacterial endophytic: ecological and practical implications. Sydowia 50:149-170
  11. . Hurek, T., y B. Reinhold-Hurek. 2003. Azoarcus sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. J. Biotechnol. 106:169-178
  12. Hameeda B, Harini G, Rupela OP, Wani SP, Reddy G 2008. Growth promotion of maize by phosphate solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. Microbiol. Res. 163:234-242
  13. Mayra Eleonora Beltrán Pineda, 2014 Phosphate solubilization as a microbial strategy for promoting plant growth.
  14. Lucía Constanza Corrales Ramírez, Zuly Yurieth Arévalo Galvez, Vanessa Estefanía Moreno Burbano, 2014, Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal.
  15. Doncel A, Chamorro L, Pérez A. 2016 Actividad in vitro de bacterias endófitas promotoras de crecimiento asociadas con pasto colosoana en el municipio de Corozal, Sucre. Rev Colombiana Cienc Anim.
  16. Chaudhry V, Sharma S, Bansal K, Patil PB. 2016 Glimpse into the genomes of rice endophytic bacteria: diversity and distribution of firmicutes. Frontiers in Microbiology.
  17. Nautiyal, SC. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganism. FEMS Microbiology Letters
  18. Álvarez C, Osorio W, Díez M, Marín M. 2014 Caracterización bioquímica de microorganismos

- rizosféricos de plantas de vainilla con potencial como biofertilizantes. *Agron. Mesoam.*
19. Otalora, J., M. Patiño, M. Martínez y A. Pedroza. 2003. Estandarización de prueba para la detección de fosfatasa producida por bacterias solubilizadoras de fosfatos. Trabajo de grado. Programa de Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
  20. FÉLIX MORONTA-BARRIOS AISLAMIENTO DE BACTERIAS ENDOFITAS DE ARROZ CON ACTIVIDADES PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO vegetal 2015 Centro de Microbiología y Biología Celular. Instituto Venezolano de Investigaciones
  21. Zhao M, Geekiyanage N, Xu J, Khin M, Nurdiana R, Paudel E, Harrison R. 2015 Structure of the Epiphyte Community in a Tropical Montane Forest in SW China. Bond-Lamberty B, ed. PLoS ONE.
  22. Doty S, Sher A, Fleck N, Khorasani M, Bumgarner R, Khan Z, Ko A, Kim S, DeLuca T. 2016 Variable nitrogen fixation in wild *Populus*. Albrechtsen BR, ed. PLoS ONE.
  23. Cach M, Andrade J, Cetzal W, Reyes C. 2016 Environmental influence on the inter- and intraspecific variation in the density and morphology of stomata and trichomes of epiphytic bromeliads of the Yucatan Peninsula. *Bot. J. Linn. Soc.*
  24. LAMB TG, TONKYN DW, KLUEPFEL DA. 1996 Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from rhizosphere to aerial plant tissue. *Can J Microbiol.*
  25. Chen Y, Rekha A, Arun A, Shen F, Lai W, Young C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 34: 33–41.
  26. Ivanova R; Bojinova. D; Nedialkova, K. 2006 Rock phosphate solubilization by soil bacteria. *Journal of the university of chemical Tecnology and Merallurgy*
  27. Kuklinsky, S.J., W. Araújo, R. Mendes, I. Olívio, K.A. Pizzirani, y J. Azevedo. 2004. Isolation and



- characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ. Microbiol*
28. Badía, M., Hernández, B., Murrel, J., Mahillon, J., & Pérez, M. 2011. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa* L). *Revista Brasileña de Agroecología*.
  29. Angulo, V. C., Sanfuentes, E. A., Rodríguez, F., & Sossa, K. E. 2014. Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*.
  30. Maheswar, N. U., & Sathiyavani, G. 2012. Solubilization of phosphate by *Bacillus* Sps. from groundnut rhizosphere (*Arachishypogaea* L). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*.
  31. T. Caballero, M. Camelo, R. Bonilla, M. Martínez 2007 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD FOSFATO SOLUIBILIZADORA POR BACTERIAS AISLADAS A PARTIR DE SUELOS ALGODONEROS EN LOS DEPARTAMENTOS DEL CESAR Y META SUELOS ECUATORIALES *Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo*.
  32. Chung H, Park M, Madhaiyan M, Seshadri S, Song J, Cho H, Sa T. 2005. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil. Biol. Biochem.* 37:1970–197
  33. Prada, L. D. 2013. Identificación de ácidos orgánicos causantes de la solubilización de fósforo inorgánico sintetizados por actinomicetos aislados de suelos en los andes orientales colombianos. (Tesis de Maestría en Ciencias - Microbiología). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
  34. Goswami, D., Pithwa, S., Dhandhukia, P., & Thakker, J. N. 2014. Delineating *Kocuria turfanensis* 2M4 as a credible PGPR: a novel IAA-producing bacteria isolated from saline desert. *Journal of Plant Interaction*.

35. Chye, Y., Y. Yin, R. Rohani, J.F. Weber, y S. Bhore. 2013. Diversity of endophytic bacteria in Malaysian plants as revealed by 16S rRNA encoding gene sequence based method of bacterial identification. *J. Young Pharm*
36. Rosalía Seña Acosta. 2018. Evaluación de la diversidad de bacterias endófitas fijadoras de Nitrógeno asociadas a dos especies del género *Tillandsia* en bosque seco tropical, Buenavista – Córdoba. Tesis de pregrado, Universidad de Córdoba Colombia.
37. Leroy C, Carrias J, Céréghino R, Corbara B. 2016 The contribution of microorganisms and metazoans to mineral nutrition in bromeliads. *J Plant Ecology*.
38. Burbano C, Grönemeyer J, Hurek T, Reinhold B. 2016 Microbial community structure and functional diversity of nitrogen-fixing bacteria associated with *Colophospermum mopane*. *FEMS Microbiol Ecol*.