

# **DIVERSIDAD DE BACTERIAS CON CAPACIDAD FIJADORA DE NITRÓGENO ASOCIADAS A LA HOJARASCA EN UN FRAGMENTO DE BOSQUE SECO TROPICAL MONTERÍA-CÓRDOBA.**

**Joiver Manuel Aleán Flórez<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.**

## **Resumen.**

En los ecosistemas terrestres el nitrógeno es un elemento de alta demanda para los organismos por lo que la productividad primaria de cualquier ecosistema está limitada por la disponibilidad de este elemento. A través de la fijación biológica de nitrógeno se aporta este elemento a los ecosistemas definiendo la fertilidad del suelo, la mayor parte del nitrógeno tomado por los vegetales es devuelta al suelo en forma orgánica por medio de la hojarasca que constituye un depósito de materia y energía para microorganismos. La hojarasca que cae al suelo se descompone por una gran variedad de microorganismos clasificados dentro de grupos funcionales que intervienen en el proceso de degradación, formando un sustrato orgánico conocido como mantillo. El objetivo de este estudio es determinar la diversidad de bacterias con capacidad fijadora de nitrógeno asociadas a la hojarasca, en un fragmento de bosque seco tropical en Montería-Córdoba. Para el desarrollo de la metodología se obtuvieron microorganismos a partir de muestras de hojarasca y mantillo del interior y borde de bosque los cuales fueron inoculados en medio libre de nitrógeno (medio Burk's). Se aislaron un total de 77 morfotipos con capacidad fijadora de nitrógeno a partir de la hojarasca en estudio de las cuales el mantillo presentó mayor diversidad de aislados con respecto a la hojarasca (40 morfotipos con una densidad total de  $115 \times 10^4$  UFC/g de mantillo). Finalmente se muestran que la hojarasca en el borde de bosque presenta mayor diversidad de fijadores de

nitrógeno que el interior del bosque, con un total de 44 morfotipos aislados y una densidad total de  $120 \times 10^4$  UFC/g de muestra.

**Palabras claves:** Hojarasca, Diversidad, Nitrógeno, Fijación.

## **ABSTRACT**

In terrestrial ecosystems, nitrogen is an element of high demand for organisms, so the primary productivity of any ecosystem is limited by the availability of this element. Through the biological fixation of nitrogen, this element is contributed to the ecosystems defining the fertility of the soil, most of the nitrogen taken up by the plants is returned to the soil in an organic form through the litter that constitutes a deposit of matter and energy. for microorganisms. The litter that falls to the ground is decomposed by a great variety of microorganisms classified within functional groups that intervene in the degradation process, forming an organic substrate known as mulch. The objective of this study is to determine the diversity of bacteria with nitrogen-fixing capacity associated with leaf litter, in a fragment of tropical dry forest in Montería-Córdoba. For the development of the methodology, microorganisms were obtained from samples of litter and mulch from the interior and edge of the forest which were inoculated in a nitrogen-free medium (Burk's medium). A total of 77 morphotypes with nitrogen-fixing capacity were isolated from the litter under study, of which the mulch presented a greater diversity of isolates with respect to the litter (40 morphotypes with a total density of  $115 \times 10^4$  CFU / g of mulch) . Finally, it is shown that the litter at the edge of the forest presents a greater diversity of nitrogen fixers than the interior of the forest, with a total of 44 isolated morphotypes and a total density of  $120 \times 10^4$ CFU / g of sample.

**Key words:** Litter, Diversity, Nitrogen, Fixation

## **INTRODUCCIÓN**

La productividad y la dinámica de los ecosistemas terrestres está limitada por la acción de los microorganismos del suelo, principalmente la actividad bacteriana la cual

cumple un papel importante siendo responsable de la mayoría de los procesos de descomposición de materia orgánica, además de la fijación de nitrógeno, mineralización de nutrientes y la estabilidad de compuestos

orgánicos en el suelo a través de procesos como la descomposición de residuos vegetales como la hojarasca y la formación de las capas superficiales del suelos. Existen factores que tienen influencia en la actividad microbiana de los suelos y pueden ser naturales como cambios climáticos, condiciones geográficas, propiedades físicas, químicas y biológicas y factores antropogénicos como lo pueden ser la contaminación y el manejo agrícola (Gregorich y Janzen, 2000; Bot y Benítez, 2005). De esta forma, en ecosistemas naturales la acumulación de hojas en la superficie del suelo ayuda a protegerlo frente a los cambios de temperatura y de humedad creando condiciones micro climáticas adecuadas para el suelo lo cual lleva a una actividad biológica alta tanto en el suelo como en su superficie. La acumulación y descomposición de hojarasca ayuda al aporte de nutrientes al suelo, además los protege contra la erosión hídrica y reduce la pérdida de agua por evapotranspiración. La hojarasca forma una capa de materia orgánica que es descompuesta a través de la actividad microbiana permitiendo el ciclo de nutrientes y la posterior transferencia de dichos nutrientes al suelo en cantidades importantes los cuales son nuevamente utilizados por las plantas. La incorporación de nutrientes en el

suelo a partir de la hojarasca es un proceso que se considera como un ciclo equilibrado resultando en condiciones casi perfectas para el crecimiento de la vegetación (Bot y Benítez, 2005).

En contraste a lo anterior, en ecosistemas terrestres perturbados por la acción antrópica, la actividad biológica se ve afectada por la reducción de la vegetación, lo cual afecta directamente a la formación de la capa de hojarasca en la superficie del suelo contribuyendo a la disminución de materia orgánica que posteriormente se introduce a los suelos quedando más expuestos, como consecuencia sufren compactación, pierden estructura, porosidad, capacidad de retención de agua y cantidad de materia orgánica, perturbando un ciclo equilibrado como lo es la circulación de nutrientes (Pinzón y Amézquita, 1991). La caída de la hojarasca representa el mayor proceso de transferencia de nutrientes de las partes aéreas de la planta hacia el suelo (Vitousek *et al.*, 1997, citado por Schlatter *et al.*, 2006). La hojarasca al caer forma un estrato orgánico conocido como mantillo, el cual cubre al suelo, permitiendo que retornen elementos nutritivos en una cantidad importante (Schlatter *et al.*, 2006). Los residuos vegetales depositados (hojas, ramas, flores y frutos) son una fuente valiosa de materia

orgánica que después de sufrir procesos de descomposición liberan elementos nutritivos que se incorporan al suelo para ser nuevamente utilizados por las plantas (Bradford, 2002, citado por Laossi *et al.*, 2008).

El humus, la fracción más estable de la materia orgánica, forma asociaciones de enlaces con partículas de arcillas, las cuales incrementan la agregación del suelo y la formación de microporos, lo que mejora la estructura del suelo (Vaast y Snoeck, 1999). Los contenidos de materia orgánica y de nitrógeno en los suelos están determinados, en primer lugar, por el clima y la vegetación y en segundo lugar, por propiedades locales como textura (con énfasis en contenido de arcillas), temperatura, capacidad de retención de humedad, pH, salinidad, contenido de materia orgánica, concentración de nutrientes y actividad microbiana (Monsalve *et al.*, 2017).

El proceso a través del cual esos microorganismos reducen el nitrógeno hasta una forma utilizable es conocido como Fijación biológica de Nitrógeno. El proceso puede ser llevado a cabo por los microorganismos en vida libre o en simbiosis con plantas, y el mismo no solo permite usar el nitrógeno atmosférico sino también

revertir o reducir la degradación del suelo (Alla y Graham, 2002; Parsons, 2004).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre además de aportar este elemento al ecosistema pueden participar en otros procesos contribuyendo así a la productividad del ecosistema, en general el beneficio de las bacterias de vida libre en el suelo esta usualmente referido como las promotoras del crecimiento vegetal que pueden tener un efecto directo o indirecto sobre la planta (Leaungvutiviroj *et al.*, 2010).

La mineralización de la materia orgánica del suelo en los ecosistemas naturales y perturbados, es una fase de alta prioridad para el suministro de nitrógeno inorgánico (Curtin y Campbell, 2008; Jarvis *et al.*, 1996), en el caso de los ecosistemas perturbados se pueden ver afectados en primera instancia los grupos funcionales de microorganismos del suelo encargados de la descomposición de este material orgánico en donde sobresalen las baterías fijadoras de nitrógeno (FBN) responsables del aporte de nitrógeno que es el principal limitante en la productividad de los cultivos y determinante en el crecimiento vegetal (Vitousek *et al.*, 1997; Fiedls, 2004), siendo claves tanto para el mantenimiento y mejora en cuanto a la fertilidad de los suelos. La diversidad de los microorganismos

presentes en el suelo depende de diversos factores como la composición química, textura, disponibilidad de agua, entre otras características que intervienen en la disponibilidad de nutrientes, así como la tensión de oxígeno en las diferentes partículas que conforman el suelo. La principal importancia de conocer la diversidad microbiana en los suelos se debe a que los microorganismos están íntimamente relacionados con la productividad de los ecosistemas (Zvyagintsev *et al.*, 1991), ya que se sabe que los microorganismos participan en los diferentes ciclos biogeoquímicos en el suelo, o interactuando con las plantas promoviendo el crecimiento vegetal aumentando la productividad del ecosistema (Garbeva *et al.*, 2004).

Teniendo en cuenta la importancia y la contribución de los microorganismos al mantenimiento y regulación de los ecosistemas terrestre, pueden ser de gran ayuda para el desarrollo de estrategias que permitan optimizar la productividad de los ecosistemas terrestres de forma natural. Por esta razón, la presente investigación tuvo como objetivo determinar diversidad de bacterias con capacidad fijadora de nitrógeno asociadas a la hojarasca en un fragmento de bosque seco tropical en el corregimiento las Palomas–Montería.

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

Este estudio es de tipo experimental descriptivo y se llevó a cabo en dos fases, una fase de campo y una fase de laboratorio bajo condiciones asépticas que comprende la esterilización previa y posterior de cada uno de los materiales utilizados y los diferentes sitios de trabajo, del mismo modo la utilización de la cámara de flujo laminar para el procesamiento y siembra de cada una de las muestras y el equipo de incubación que permitieron la reproducibilidad de los ensayos.

### **Fase de campo.**

En esta etapa del estudio se realizó la identificación del sitio de muestreo y la recolección del material vegetal.

### **Identificación del sitio de muestreo.**

Este estudio se llevó a cabo en un fragmento de bosque seco tropical (bs-T) ubicado en la finca “El Pino” en el corregimiento Las Palomas, Montería Córdoba (08°25'09" N - 76°03'24,8" W 65). Con una temperatura promedio de 27° C y una precipitación anual promedio de 1200 mm. (**Figura 1**).

## Muestreo.

Se recolectaron muestras de hojarasca haciendo una distinción del material en estudio, tomando la hojarasca dispersa y la materia orgánica semi-descompuesta o llamado mantillo. Para la recolecta de

muestras se seleccionaron cuatro puntos distintos distribuidos en el borde e interior del bosque, donde se anotaron características de las muestras como abundancia, humedad, y profundidad de la materia orgánica (hojarasca y mantillo) para la distinción de estas zonas (**Tabla 1**).

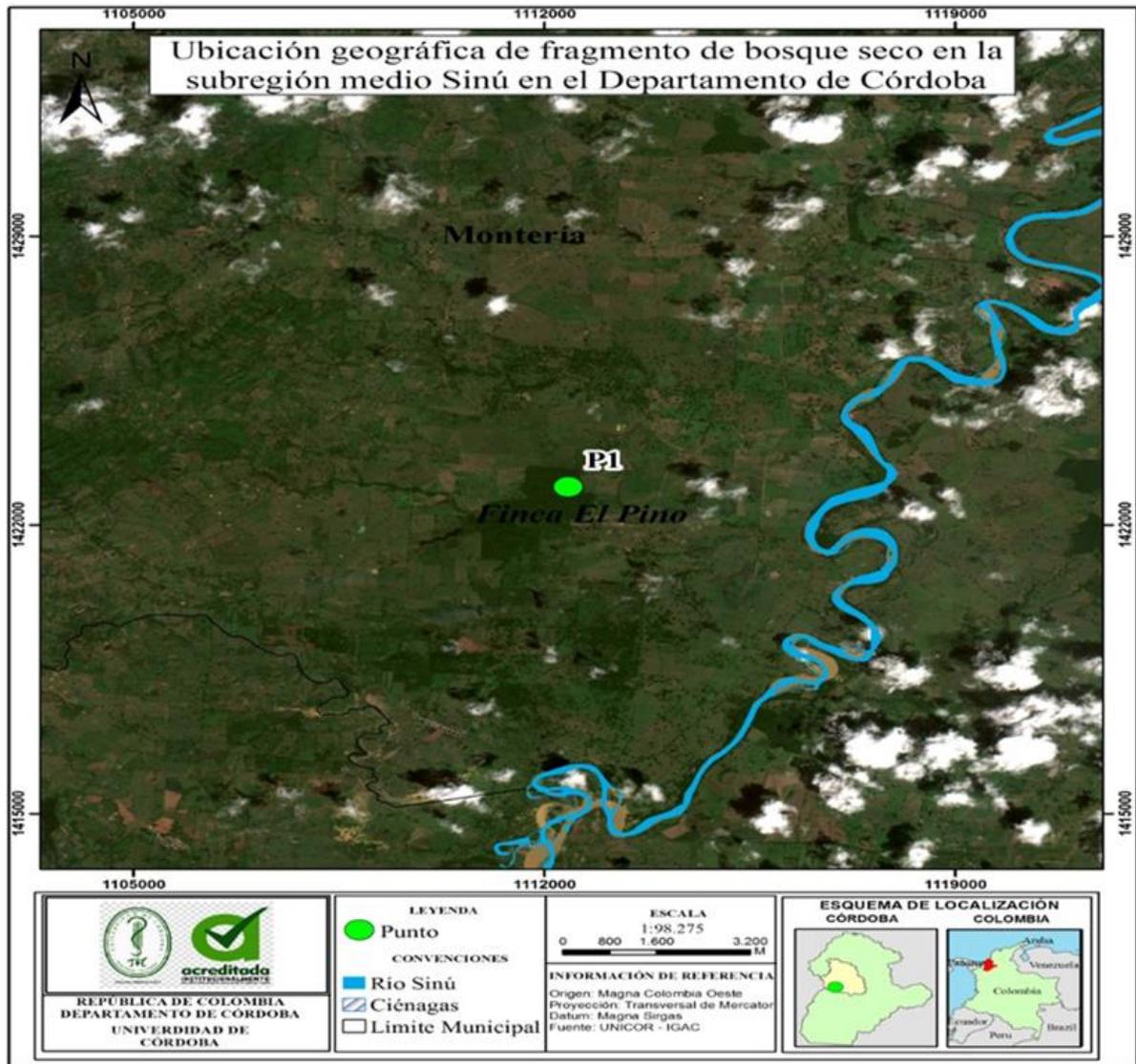


Figura 1. Zona de Muestreo.

En cada punto se recolectaron 15 g de muestras de hojarasca y mantillo, cada una de estas muestras estuvo compuesta por cuatro submuestras tomadas con una distancia de 5-6 metros de separación entre ellas. En total se obtuvieron 32 muestras, las cuales fueron depositadas en bolsas ziploc y rotuladas teniendo en cuenta el sitio donde fueron

colectadas y el tipo de muestra, a continuación fueron almacenadas en una nevera portátil con temperatura de 4°-5° C hasta su posterior procesamiento en el laboratorio, esto con el objetivo de no modificar ninguna de las condiciones físicas, químicas y biológica.

**Tabla 1:** Características de las muestras de hojarasca y mantillo en las distintas zonas.

Sitios de muestreo		Hojarasca	Mantillo
<b>Borde del bosque</b>	<b>Zona 1</b>	Abundante, húmeda y poco profunda (2 cm)	Abundante húmedo y parcialmente profundo (3 cm)
	<b>Zona 2</b>	Abundante, húmeda y profunda (4 cm)	Abundante, muy húmedo y profundo (5-8 cm)
<b>Interior del bosque</b>	<b>Zona 3</b>	Poca hojarasca muy húmeda y muy poco profunda (< 1 cm).	Húmedo, poco distinguido del suelo (1 cm de profundidad)
	<b>Zona 4</b>	Abundante, poco húmeda y poco profunda (2 cm)	Mantillo poco húmedo y poco profundo (2-3 cm)

### Fase de laboratorio

Inicialmente se tomó 1 gramo de cada submuestra de hojarasca y mantillo las cuales se suspendieron en 20 ml de solución salina (NaCl al 0.85% p/v) sobre un mortero, a continuación, fueron maceradas durante aproximadamente dos minutos hasta obtener una solución matriz de cada una de las submuestras las cuales posteriormente fueron

filtradas utilizando un embudo de filtración y papel filtro con el fin de descartar impurezas insolubles. A cada una de estas soluciones obtenidas se les realizó una dilución en serie tomando 1 ml de cada una de las soluciones madre con ayuda de una pipeta y depositados en tubos con 9 ml de solución salina hasta un factor de dilución de  $10^{-4}$ , para llevar a cabo la estandarización de las diluciones a utilizar en este estudio.

### **Aislamiento y conteo de microorganismo fijadores de nitrógeno**

El aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) de vida libre se realizó a través de la metodología propuesta por Doncel *et al.*, (2014), se tomó 1 ml de cada una de las muestras obtenidas y se realizó una siembra directa en cajas de petri con medio de cultivo Burk's, este medio carece de nitrógeno y comprende: sacarosa 10 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.41 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.52 g,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.05 g,  $\text{CaCl}_2$  0.2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.005 g,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.0025 g y agar 1.8 g por litro. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 10 días hasta la observación de colonias traslucidas. Cada uno de los aislados fueron rotulado con distintos códigos para su diferenciación teniendo en cuenta el sitio de muestreo y el tipo de muestra. Para realizar el conteo se escogió solo una dilución ( $10^{-4}$ ) a través de la cual se establece la densidad de los grupos funcionales de todas las muestras, dicha densidad se estimó por conteo directo de colonias en placas (UFC/g de hojarasca y/o mantillo). Durante el conteo se observaron y se seleccionaron las colonias que se distinguían en cuanto a forma, elevación, borde, aspecto de la superficie, color y tamaño.

La diversidad de las BFN se estimó a través de los morfotipos seleccionados los cuales fueron purificados y conservados en agar R<sub>2</sub>A para su posterior evaluación *in vitro* y análisis bioquímico.

### **Caracterización bioquímica y microscópica.**

Para llevar a cabo la caracterización bioquímica de las bacterias aisladas se aplicó una batería bioquímica, que consiste en pruebas bioquímicas indispensables que incluye un grupo de cuatro pruebas usadas para diferenciar posibles microorganismos entéricos (Indol, Rojo de Metilo, Voges-Proskauer y Citratos) y adicionalmente TSI (triple azúcar hierro), prueba de catalasa y producción de gases. Adicionalmente las bacterias aisladas se analizaron con tinción de Gram.

### **Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de varianza por ANOVA simple de un factor, para determinar diferencias entre morfotipos fijadores de nitrógeno aislados y densidades poblacionales (UFC/g de muestra) en función de los sitios de muestreo (borde e interior del bosque).

## RESULTADOS

### Diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas.

El aislamiento de microorganismos en medio libre de nitrógeno, como el medio Burk`s, constituye un primer paso para la identificación de bacterias con capacidad para fijar nitrógeno, el análisis del número y tipo de microorganismos identificados en este medio ofrece información valiosa sobre la diversidad de microorganismos potencialmente fijadores de Nitrógeno en los diferentes sitios muestreados. En total se aislaron 77 morfotipos con capacidad fijadora de nitrógeno, a partir de las diferentes muestras de hojarasca de las distintas zonas muestreadas.

Teniendo en cuenta el número de morfotipos aislados a partir de la capa hojarasca dispersa, los resultados muestran a la **zona 1** perteneciente al borde de bosque, como la zona con mayor número de morfotipos fijadores de nitrógeno con 12 morfotipos en total, seguida de la **zona 4** del interior del bosque y **zona 2** del borde del bosque con 10 y 8 morfotipos respectivamente, y por último la **zona 3** del interior del bosque con 7 morfotipos fijadores de nitrógeno.

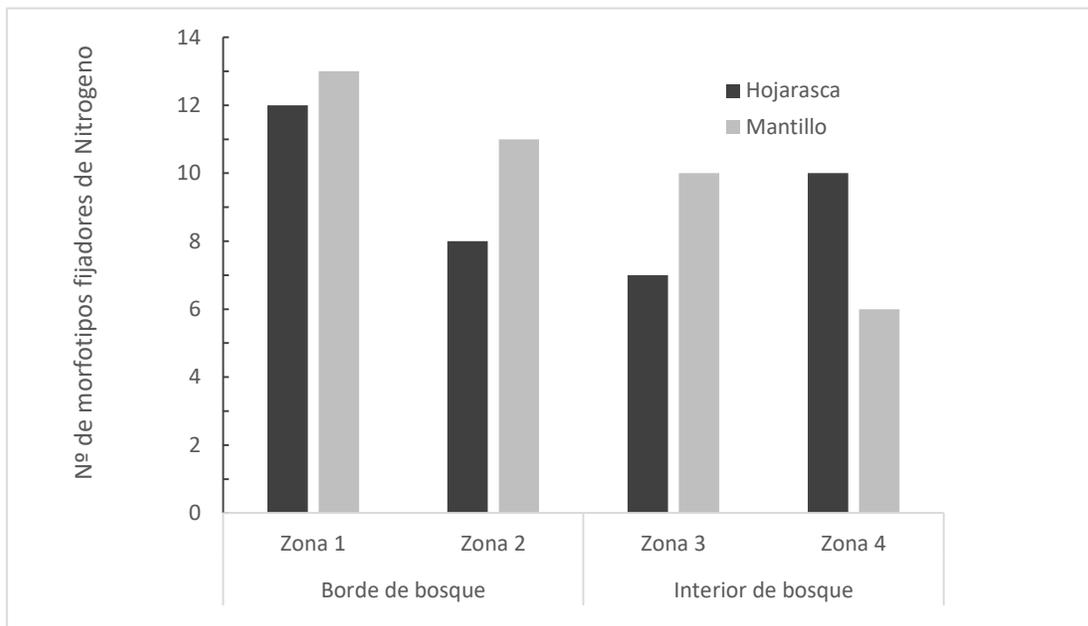
Con respecto al mantillo las zonas con mayor cantidad de morfotipos fijadores de nitrógeno aislados fueron las **zonas 1 y 2** del borde de bosque, con 13 y 11 morfotipos respectivamente, mientras que en el borde de bosque en las **zonas 3** se aislaron 10 morfotipos y en la **zona 4** se aislaron 6 morfotipos con dicha capacidad (**figura 2**).

En este caso no se evidencia diferencias estadísticamente significativas en el número morfotipos encontrados entre un punto de muestreo y otro ( $p > 0,05$ ).

La abundancia en cuanto a la hojarasca dispersa, los resultados muestran que en la **zona 1** ubicada en el borde de bosque presenta mayor densidad de bacterias fijadoras de nitrógeno con  $35 \times 10^4$  UFC/g de hojarasca seguida de la **zona 4** que corresponde al interior del bosque con  $27 \times 10^4$  UFC/g de hojarasca, la densidad de bacterias fijadoras de nitrógeno en la **zona 2** del borde del bosque y la **zona 3** ubicada en el interior del bosque fueron de  $15 \times 10^4$  y  $20 \times 10^4$  UFC/g de hojarasca respectivamente. Con relación al mantillo se muestra que la **zona 1** y la **zona 2** ubicadas en el borde de bosque presentan mayor recuento de bacterias fijadoras de nitrógeno con  $53 \times 10^4$  y  $23 \times 10^4$  UFC/g de mantillo respectivamente. En la **zona 3** y **4** ubicadas

en el interior del bosque se muestra una menor densidad de bacterias fijadoras de

nitrógeno con valores de  $22 \times 10^4$  y  $17 \times 10^4$  UFC/g mantillo respectivamente (**figura 3**).

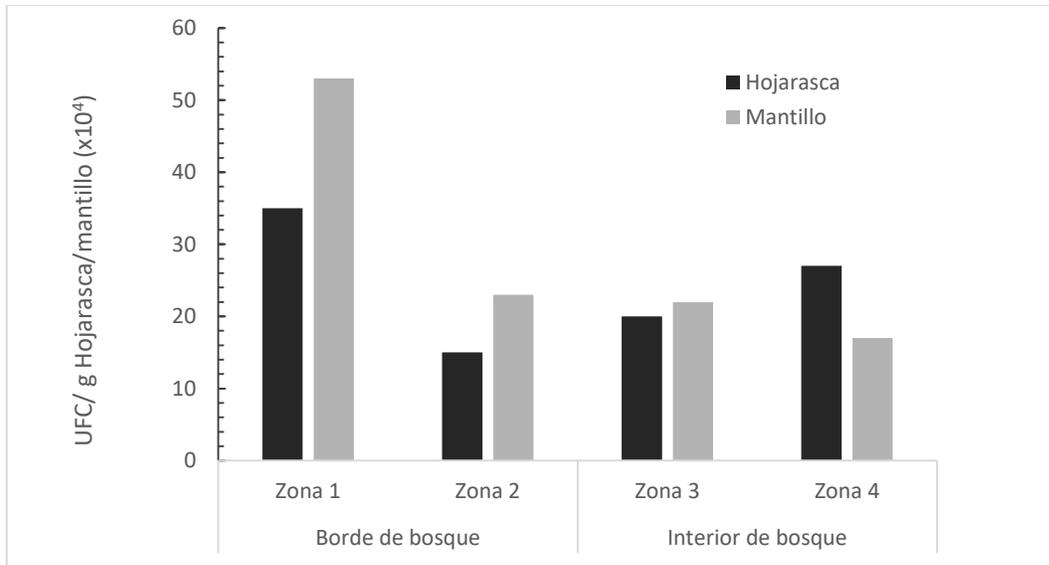


**Figura 2.** Número de morfotipos con capacidad fijadora de nitrógeno aislados de la hojarasca en diferentes zonas ubicadas en borde e interior de bosque en un bosque seco tropical en Córdoba 2019.

De igual forma no se muestran diferencias estadísticamente significativas en el recuento (densidad poblacional) de bacterias fijadoras de nitrógeno entre un punto de muestreo y otro ( $p > 0,05$ )

Con relación a la hojarasca en estudio, en el mantillo se aislaron 40 morfotipos con una densidad total de  $115 \times 10^4$  UFC/g de mantillo, mientras que en la capa de hojarasca

fueron aislados 37 morfotipos y un total de  $97 \times 10^4$  UFC/g de hojarasca. Respecto a los sitios de muestreos, el borde de bosque presenta mayor número de morfotipos con capacidad fijadora de nitrógeno, con un total de 44 morfotipos aislados y una densidad total de  $120 \times 10^4$  UFC/g de muestra. Al interior del bosque se aislaron 33 morfotipos fijadores de nitrógeno en total con una densidad de  $86 \times 10^4$  UFC/g de muestra.



**Figura 3.** Abundancia ( $\times 10^4$  UFC/ g Hojarasca/mantillo) de bacterias con potencial fijador nitrógeno a partir de la hojarasca en diferentes zonas ubicadas en borde e interior de bosque en un bosque seco tropical en Córdoba 2019

### **Caracterización de bacterias con capacidad de fijar Nitrógeno.**

En el proceso de aislamiento a partir de las muestras de hojarasca, cada uno de estos morfotipos fueron codificados según el sitio y el tipo de materia orgánica a partir del cual fueron aislados. Los microorganismos aislados que crecieron en el medio libre de nitrógeno, mostraron características como, virajes de color beige, amarillento y blancuzco, algunas transparentes y de consistencia acuosa o de mucosidad y otras con una consistencia viscosa. A través de la observación microscópica correspondientes de las muestras se pudo establecer que 50 morfotipos fijadores de nitrógeno fueron

bacilos y cocos Gram positivos y 27 morfotipos fueron cocos y bacilos Gram negativos. Teniendo en cuenta cada una de las pruebas bioquímicas realizadas podemos evidenciar que de estos 77 morfotipos aislados 16 presentaron capacidad de metabolizar triptófano evidenciado a través de la formación de indol. De estos morfotipos 26 presentan capacidad utilizar citrato como fuente de carbono y compuestos amoniacales como fuente de nitrógeno. Dentro de estos 77 morfotipos aislados solo un morfotipo no presenta capacidad de fermentar carbohidratos entre los 76 morfotipos con dicha capacidad de fermentación se encontraron 7 morfotipos que son solo

fermentadores de glucosa evidenciándose además 16 morfotipos capaces de producir gases. En total 18 morfotipos son capaces de generar  $\text{SH}_2$  en diferentes medios al reaccionar con tiosulfato de hierro mostrándose de color negro. La mayoría de los aislados en total 73 poseen la enzima catalasa capaz de descomponer el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno.

Adicionalmente en una prueba en medio semisólido se pudo ver que 75 morfotipos muestran enturbiamiento del medio mostrando capacidad de movilidad. Además de los morfotipos bacteriano aislados, se pudieron evidenciar 5 morfotipos de hongos con capacidad de crecer en medio libre de nitrógeno.

**Tabla 2:** Características bioquímicas de los morfotipos aislados a partir de las muestras de hojarasca

Morfotipo	INDOL	Rojo Metilo	V-G	Citrato	TSI	Producción de gas	SH2	Catalasa
1B1H 1	-	-	+	-	A/A	+	-	+
1B1H 2	-	+	+	-	A/A	-	-	+
1B2H 3	-	-	+	-	R/A	-	-	+
1B2H 3"	-	+	+	-	A/A	-	-	+
1B2H 4	-	-	+	-	R/A	-	-	+
1B2H 5	-	+	+	-	A/A	-	-	+
1B2H 6	+	+	+	-	A/A	-	-	+
1B2H 7	+	-	+	-	A/A	-	-	+
1B2H 8	+	-	+	-	R/A	+	-	+
1B4H 9	-	+	+	-	A/A	-	-	-
1B4H 10	-	+	+	-	A/A	+	-	-
1B4H 11	-	+	+	-	A/A	-	-	+
2B1H 12	-	+	+	-	A/A	-	-	+
2B1H 13	-	+	+	-	A/A	-	-	+
2B2H 14	-	-	+	-	A/A	-	+	+
2B2H 15	-	+	+	+	A/A	-	+	+
2B2H 16	-	-	+	-	R/A	-	+	+
2B3H 17	-	+	+	-	A/A	-	-	+
2B4H 18	-	+	+	-	A/A	-	-	-
2B4H 19	-	-	+	-	A/A	-	-	+
3I1H 20	-	+	-	+	Totalmente negra	+	+	+
3I1H 21	-	-	-	+	A/A	-	+	+
3I2H 22	+	+	+	-	A/A	+	+	+
3I2H 23	-	+	+	-	A/A	-	-	+
3I3H 24	-	+	+	-	A/A	-	+	+
3I4H 25	-	+	+	-	A/A	-	-	+
3I4H 26	-	+	+	-	A/A	+	-	+
4I1H 27	-	-	+	-	A/A	+	-	+
4I2H 28	-	+	+	+	A/A	+	+	+
4I2H 29	-	-	+	-	A/A	+	-	+
4I2H 30	-	-	+	-	A/A	+	+	+
4I2H 31	+	-	+	-	A/A	+	-	+
4I2H 32	-	+	+	-	A/A	+	+	+
4I3H 33	-	-	+	-	A/A	+	-	+
4I3H 34	+	+	+	-	A/A	+	-	+
4I4H 35	+	+	+	-	A/A	-	+	+
4I4H 36	-	+	+	+	A/A	-	-	+

**Tabla 3:** Características bioquímicas de los morfotipos aislados a partir de las muestras de mantillo

Morfotipo	INDOL	Rojo Metilo	V-G	Citrato	TSI	Producción de Gas	SH2	Catalasa
1B1M 1	+	+	+	+	A/A	-	-	+
1B1M 2	-	-	-	-	R/R	-	-	+
1B1M 3	-	+	-	-	A/A	-	-	+
1B1M 4	+	-	-	+	A/A	-	+	+
1B1M 5	+	-	+	-	A/A	-	-	+
1B2M 6	+	+	-	+	A/A	-	-	+
1B2M 7	-	+	-	-	A/A	-	-	+
1B2M 8	-	+	-	+	A/A	-	-	+
1B2M 9	-	+	+	-	A/A	-	-	+
1B3M 12	-	-	-	+	A/A	-	-	+
1B3M 13	-	+	-	+	A/A	-	-	+
1B4M 14	-	+	-	-	A/A	-	-	+
1B4M 15	-	-	-	-	A/A	-	-	+
2B1M 16	-	-	-	+	A/A	-	-	+
2B1M 17	-	-	-	+	A/A	-	+	+
2B1M 18	-	-	+	+	A/A	+	+	-
2B1M 19	-	-	+	-	R/A	-	-	+
2B1M 20	-	-	-	-	A/A	-	-	+
2B2M 21	-	-	+	-	A/A	-	-	+
2B2M 22	+	+	+	+	A/A	-	+	+
2B3M 23	-	-	-	-	A/A	-	-	+
2B3M 24	-	+	+	-	A/A	-	-	+
2B4M 25	-	+	+	-	A/A	-	-	+
2B4M 26	-	+	-	+	A/A	-	-	+
3I1M 27	-	+	-	-	A/A	-	-	+
3I1M 28	-	+	+	+	R/A	-	-	+
3I1M 29	-	-	+	+	A/A	+	-	+
3I2M 30	-	-	+	+	A/A	-	-	+
3I2M 31	-	+	+	-	A/A	-	-	+
3I2M 32	-	+	+	-	A/A	-	-	+
3I3M 33	-	-	+	-	A/A	-	+	+
3I4M 34	-	+	-	-	A/A	-	-	+
3I4M 35	-	+	-	+	A/A	-	-	+
3I4M 36	+	+	+	+	A/A	-	-	+
4I1M 37	-	-	-	+	A/A	-	-	+
4I3M 39	-	-	-	+	A/A	-	-	+
4I3M 40	+	+	-	+	R/A	-	-	+
4I3M 41	+	+	+	+	A/A	-	-	+
4I3M 42	+	-	+	+	A/A	-	-	+
4I4M 43	-	-	-	-	A/A	-	-	+

## DISCUSIÓN.

De acuerdo a estos resultados se encontró un mayor número de morfotipos y una mayor abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno en hojarasca en las zonas del borde de bosque este resultado es interesante puesto que de cierta forma contrasta con la mayor riqueza de especies vegetales que se pueden encontrar en el interior del bosque las cuales aportan mayor cantidad de materia orgánica disponible para su posterior descomposición en el suelo lo cual concuerda con lo planteado por Archer y Pike (1991), quienes manifiestan que en ecosistemas disturbados las reducciones en la biomasa vegetal pueden reducir la energía para los organismos del suelo, es posible que la escases de cobertura y la homogeneidad en cuando a la vegetación en las zonas de borde de bosque favorezcan el establecimiento y diversificación funcional de grupos de microorganismos específicos.

Por ende es posible que en ecosistemas intervenidos donde especies microbianas con metabolismos fácilmente adaptables como lo es la fijación de nitrógeno a condiciones nuevas (por procesos de sucesión luego de deforestaciones o quemas) ocasione la formación de grupos funcionales específicos disminuyendo de esta forma la gran diversidad de microorganismos presentes en

estas coberturas como lo plantea Escobar (2003), lo cual puede evidenciarse por la cobertura vegetal de ésta, siendo más homogénea puede proveer una abundante aunque poco diversa fuente de recursos que aparentemente puede favorecer el crecimiento de grupos más restringidos de microorganismos entre ellos los fijadores de nitrógeno (Cardona, 2004).

Las hojarasca en las zonas de borde de bosque por lo general presentan una mejor aireación en comparación al interior del bosque esto favorece al suelo mejorando su estructura física (Cardona, 2004). Teniendo en cuenta que los ecosistemas boscosos perturbados por medio de la tala y quema transforman la estructura del suelo y de sus capas superficiales produciendo la muerte de muchos microorganismos presentes, la fijación de nitrógeno se convierte en una de las principales rutas para la recuperación del suelo (Gehring *et al.*, 2005) por lo cual las bacterias con capacidad para fijar el nitrógeno de la atmósfera pueden aumentar sus poblaciones al tener una ventaja competitiva y colonizar espacios que antes eran ocupados por otros grupos bacterianos (Peña y Venegas, 2004; Cardona 2004) lo que podría indicar que estas poblaciones se recuperan rápidamente tras algún tipo de disturbio o condiciones ambientales poco

favorables. Todos estos factores en conjunto pueden llevar a una contribución en donde se puede ver favorecida una mayor dinámica de nutrientes a través de la descomposición de la materia orgánica y todo esto lleva a la creación de microambientes ideales como temperaturas óptimas, diversos sustratos, acumulación alta y permanente de residuos de diversas especies vegetales los cuales son colonizados por bacterias potencialmente fijadoras.

Por el contrario, según Dalton y Kramer, (2006) las hojarascas en las zonas del interior del bosque pueden sufrir cambios en cuanto a la humedad por inundaciones temporales perjudicando la disponibilidad de nutrientes la formación de las capas superficiales del suelo y su estructura como también la abundancia de microorganismos presentes en estos ecosistemas, en el interior del bosque se encontró una menor abundancia de bacterias con potencial para fijar nitrógeno con respecto al borde del bosque teniendo en cuenta que se caracterizan por tener una mayor diversidad de especies vegetales y un continuo movimiento de nutrientes distintos al nitrógeno además de presentar una gran variedad de microhábitats con diversos sustratos con acumulación alta y permanente de residuos de diversas especies vegetales lo cual no ocurre en el borde del bosque,

Torsvik *et al.*, (1996) indican que esto favorece a microorganismos capaces de utilizar fuentes alternas de nutrientes más eficientemente que las bacterias fijadoras

Los resultados obtenidos permitieron demostrar que la diversidad de grupos funcionales fijadores de nitrógeno según la abundancia de estos microorganismos en el mantillo con respecto a la hojarasca dispersa es mayor, donde quizás las condiciones de humedad y profundidad del mantillo están íntimamente relacionadas con la diversidad de estos grupos funcionales lo cual concuerda con lo propuesto por Cao *et al.* (2008) quienes afirman que hay mayor actividad microbiana en la superficie del suelo, más precisamente en el mantillo, que en la hojarasca y en las capas profundas teniendo en cuenta el abastecimiento de carbono fresco que proviene de la biomasa vegetal y el aumento de materiales orgánicos e inorgánicos los cuales sirven como sustratos para una comunidad microbiana abundante y activa.

Se puede notar que la densidad y número de morfotipos de fijadores de nitrógeno aislados a partir del mantillo disminuye teniendo en cuenta su ubicación en el bosque lo cual se ve reflejado en la cantidad de mantillo disponible a través de su profundidad más

allá de cualquier otro factor en cada una de las zonas estudiadas.

Adicionalmente estos resultados concuerdan con los propuesto por Martínez (2013) quien realizó un estudio sobre la producción y descomposición de hojarasca en sistemas silvopastoriles de estratos múltiples en el valle medio del Río Sinú en el cual evaluó la presencia y actividad de microorganismos del suelo en sistemas silvopastoriles donde encontró que la abundancia de bacterias fijadoras de  $N_2$  – FBN - es afectada significativamente por la profundidad y por el arreglo silvopastoril al igual que otros grupos funcionales como los solubilizadores de fosfato; también se presentó un mayor número de FBN en el mantillo.

Martínez (2013) muestra que el mantillo de arreglo silvopastoril más complejos presentan una mayor abundancia de microorganismos fijadores de Nitrógeno que el de las pasturas (p.150) lo cual corrobora con lo expresado por Brussaard (2007) y Moorhead *et al.*, (1996) que el mejoramiento del suelo trae consigo no sólo materia orgánica y nutrientes sino soporte para una gran cantidad de microorganismos que pueden cumplir funciones ecológicas relevantes. Entre estas funciones están la fijación biológica de  $N_2$ , la amonificación y

la solubilización de fosfato las cuales son determinantes para mantener un adecuado flujo de nutrientes (Schroth y Krauss, 2006; Dilly, 2005; Liiri *et al.*, 2002; Trasar *et al.*, 2000) y así son determinantes de la fertilidad del suelo. En cuanto a la hojarasca con respecto a los factores tenidos en cuenta la cantidad de hojarascas disponible para la descomposición es el principal elemento para manifestar la abundancia y riqueza de estos grupos funcionales, aunque de alguna forma este resultado ratifica que dicha abundancia y número de morfotipo aislados puede depender más de la calidad de la hojarasca contenido y relación de nutrientes que de otros factores.

Si bien los resultados de éste estudio representan una alta diversidad de bacterias capaces de fijar nitrógeno, dichos resultados eran de esperarse teniendo en cuenta que la hojarasca producida por diferentes especies se convierte en la principal fuente de carbono y otros nutrientes para los microorganismos, a pesar de esto hay poca información relaciona en la literatura científica sobre estos grupos funcionales y su diversidad en hojarasca y mantillo en fragmentos de bosque seco. Aunque varios autores como Peña y Venegas (2004) mencionan la importancia de la fijación biológica de nitrógeno por parte de estos microorganismos en la dinámica la

materia orgánica del suelo usualmente no se presentan datos que correspondan a riqueza abundancia de especies fijadoras de nitrógeno en hojarasca o mantillo.

### **CONCLUSIONES.**

El amplio número de morfotipos encontrados en la hojarasca en estudio permite establecer una alta diversidad de microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre.

La hojarasca encontrada en el fragmento de bosque seco tropical en el departamento de Córdoba cuenta con gran cantidad de microorganismos con capacidad de fijar nitrógeno, resaltando mayor concentración de estos en el mantillo en comparación con la hojarasca.

Existe mayor diversidad de bacterias con capacidad fijadora de nitrógeno en las zonas pertenecientes al borde de bosque en comparación a las zonas ubicadas en el interior del bosque.

### **Agradecimientos.**

Este trabajo se desarrolló bajo el marco del megaproyecto de Diversidad funcional en fragmentos de bosque seco tropical del departamento de Córdoba: Bases para la conservación y manejo de ecosistemas amenazados, a mis directores por su tiempo y dedicación en este trabajo.

### **Bibliografía.**

- Alla, D y Graham, P. (2002). Interacciones simbióticas en la ecología de las cianobacterias. Whitton, B. A. y M. (ed), Dordrecht, Países Bajos: El Academico Kluwer Publ. págs. 523-561.
- Archer, S. y Pyke, DA (1991). Interacciones entre plantas y animales que afectan el establecimiento y la persistencia de las plantas en los pastizales revegetados. *Ecología y gestión de pastizales / Journal of Range Management Archives* , 44 (6), 558-565.
- Bot A. y Benites J. (2005). La importancia de la materia orgánica del suelo: clave para suelos resistentes a la sequía y producción sostenida de alimentos (No. 80). Org. De Agricultura y Alimentación.
- Brussaard L. De Ruiten PC y Brown GG (2007). Biodiversidad del suelo para la sostenibilidad agrícola. *Agricultura ecosistemas y medio ambiente* 121 (3) 233-244.
- Cao C. Jiang D. Teng X. Jiang Y. Liang W. y Cui Z. (2008). Propiedades químicas y microbiológicas del suelo a lo largo de una cronosecuencia de *Caragana microphylla* Lam. plantaciones en la tierra arenosa de Horqin en el noreste de

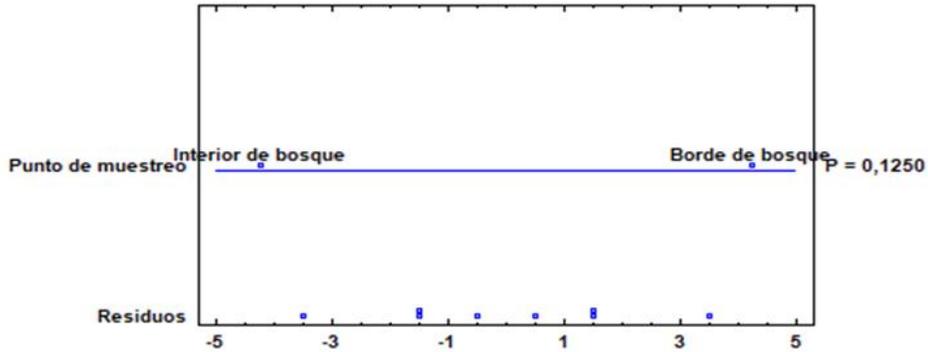
- China. *Ecología aplicada del suelo* 40 (1) 78-85.
- Cardona G. I. (2004). Evaluación de la diversidad de actinomicetos en suelos bajo tres coberturas vegetales en el sur del trapezio amazónico colombiano (Doctoral dissertation Tesis M. Sc Pontificia Universidad Javeriana Bogotá DC Colombia).
  - Curtin D. y Campbell C. A. (2008). Nitrógeno mineralizable. Muestreo de suelos y métodos de análisis 2 599-606.
  - Dalton D. A. y Kramer S. (2006). Bacterias asociadas a plantas. Bacterias fijadoras de nitrógeno en no leguminosas. Springer Dordrecht Holanda 105-130.
  - Dilly, O. (2005). Energética microbiana en suelos. En *Microorganismos en suelos: roles en génesis y funciones* (pp. 123-138). Springer, Berlín, Heidelberg.
  - Escobar L. F. Barrios E. & Varela A. (2003). Efecto del sistema de uso del suelo sobre la abundancia de poblaciones nativas de rizobios en la microcuenca potrero departamento del Cauca. Trabajo de grado. Facultad de Estudios Ambientales y Rurales Carrera de Ecología Pontificia Universidad Javeriana Bogotá.
  - Fields, S. (2004). Nitrógeno global: ciclar fuera de control.
  - Garbeda P. van Veen JA van Elsas JD. (2004). Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Ann Rev Phytopathologica* 42:243-70.
  - Gehring C. Vlek PL de Souza LA y Denich M. (2005). Fijación biológica de nitrógeno en rebrote secundario y bosque lluvioso maduro de la Amazonia central. *Agricultura ecosistemas y medio ambiente* 111 (1-4) 237-252.
  - Gregorich, E. G. y Janzen, H. H. (2000). Descomposición. *Manual de ciencia del suelo*, C107-C120.
  - Jarvis, SC, Stockdale, EA, Shepherd, MA y Powlson, DS (1996). Mineralización de nitrógeno en suelos agrícolas templados: procesos y medición. En *Advances in Agronomy* (Vol. 57, págs. 187-235). Prensa académica.
  - Laossi, K. R., Barot, S., Carvalho, D., Desjardins, T., Lavelle, P., Martins, M., & Velasquez, E. (2008). efectos de la diversidad vegetal en la producción de biomasa vegetal y macrofauna del suelo en pastizales amazónicos. *Pedobiologia*, 51 (5-6), 397-407.
  - Leungvutiviroj, C., Ruangphisarn, P., Hansanimitkul, P., Shinkawa, H., & Sasaki, K. (2010). Desarrollo de un nuevo

- biofertilizante con alta capacidad de fijación de N<sub>2</sub>, solubilización de fosfato y potasio y producción de auxinas. *Biociencia, biotecnología y bioquímica*, 74 (5), 1098-1101.
- Liiri, M., Setälä, H., Haimi, J., Pennanen, T., & Fritze, H. (2002). La relación entre la diversidad de especies de microartrópodos del suelo y el crecimiento de las plantas no cambia cuando se perturba el sistema. *Oikos*, 96 (1), 137-149.
  - Martínez Atencia J. D. C. (2013). Producción y descomposición de hojarasca en sistemas silvopastoriles de estratos múltiples y su efecto sobre propiedades bioorgánicas del suelo en el valle medio del Río Sinú.
  - 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. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 351-360.
  - Moorhead, D. L., Sinsabaugh, R. L., Linkins, A. E., & Reynolds, J. F. (1998). Procesos de descomposición: enfoques y aplicaciones de modelado. *Ciencia del medio ambiente total*, 183 (1-2), 137-149.
  - Monsalve C, O. I., Gutiérrez-D, J. S., & Cardona, W. A. (2017). Factores que intervienen en el proceso de mineralización de nitrógeno cuando son aplicadas enmiendas orgánicas al suelo. Una revisión. *Revista Colombiana de Ciências Horticolas*, 11(1), 200-209.
  - Parsons, R. (2004). *Metabolismo Planta-Microbio*. Disponible en: [www.personal.dundee.ac.uk/rparsons/andfrank.htm](http://www.personal.dundee.ac.uk/rparsons/andfrank.htm).
  - Peña y Venegas, C. P. (2004). Ficha BPIN: mantenimiento de la fertilidad del suelo y generación de tecnologías para la recuperación de áreas degradadas en la amazonía colombiana. Informe final anual, Instituto Sinchi, Leticia, Colombia.
  - Pinzón, A., & Amézquita, E. (1991). Compactación de suelos por el pisoteo de animales en pastoreo en el piedemonte amazónico de Colombia. *Pasturas tropicales*, 13(2), 21-26.
  - Schlatter, J. E., Gerding, V., & Calderón, S. (2006). Aporte de la hojarasca al ciclo biogeoquímico en plantaciones de *Eucalyptus nitens*, X Región, Chile. *Bosque (Valdivia)*, 27(2), 115-125.
  - Schroth, G. y Krauss, U. (2006). Manejo biológico de la fertilidad del suelo para la

- agrosilvicultura de cultivos arbóreos. Enfoques biológicos para sistemas de suelos sostenibles, 291-303.
- Torsvik, V., Sørheim, R., & Goksøyr, J. (1996). Diversidad bacteriana total en comunidades de suelos y sedimentos: una revisión. *Revista de microbiología industrial*, 17 (3-4), 170-178.
  - Trasar-Cepeda, C., Leiros, M. C., & Gil-Sotres, F. (2000). Propiedades bioquímicas de suelos ácidos bajo vegetación clímax (robleal atlántico) en una zona de la zona templada-húmeda europea (Galicia, NO de España): parámetros específicos. *Biología y bioquímica del suelo*, 32 (6), 747-755.
  - Vaast, P., & Snoeck, D. (1999). Hacia un manejo sostenible de la materia orgánica y de la fertilidad biológica de los suelos cafetaleros.
  - Vitousek, P. M., Aber, J. D., Howarth, R. W., Likens, G. E., Matson, P. A., Schindler, D. W., ... & Tilman, D. G. (1997). Alteración humana del ciclo global del nitrógeno: fuentes y consecuencias. *Aplicaciones ecológicas*, 7 (3), 737-750.
  - Zvyagintsev, D. G., Kurakov, A. V., & Filip Z. (1991). Diversidad microbiana de bosques, campos y suelos contaminados por plomo sodio-podzólico.

**Anexos.**

**Tabla 4:** Análisis de varianza para morfotipos fijadores de Nitrógeno aislados.

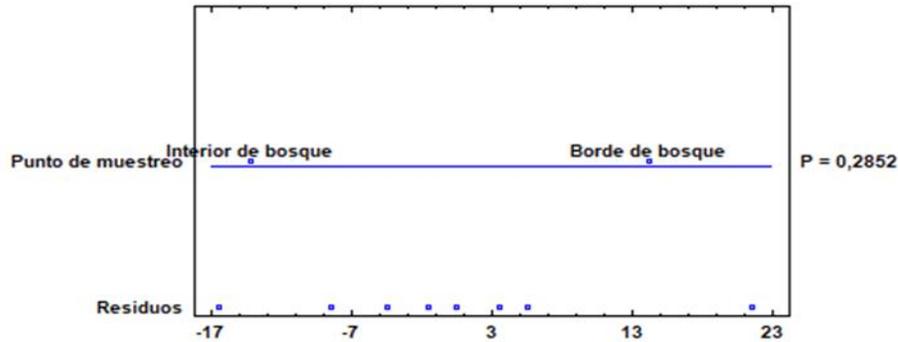


**Tabla ANOVA para Morfotipos encontrados por Punto de muestreo**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	18,0	1	18,0	3,18	0,1250
Intra grupos	34,0	6	5,66667		
Total (Corr.)	52,0	7			

\* Nivel de confianza del 95%

**Tabla 5:** Análisis de varianza para densidades poblacionales (UFC/g de muestra) fijadores de Nitrógeno.



**Tabla ANOVA para Densidad de Fijadoras de N por Punto de muestreo**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	200,0	1	200,0	1,38	0,2852
Intra grupos	872,0	6	145,333		
Total (Corr.)	1072,0	7			

\* Nivel de confianza del 95%