

## **DIVERSIDAD DE BACTERIAS CON CAPACIDAD DE FIJAR NITROGENO ASOCIADAS A DOS ESPECIES DEL GÉNERO *Tillandsia* (L.) EN BOSQUE SECO TROPICAL, CORREGIMIENTO LAS PALOMAS–MONTERÍA**

Daniel Hoyos Ramos<sup>1</sup>, Orfa Inés Contreras Martínez, MSc<sup>2</sup>, Juan Carlos Linares Arias, MSc<sup>3</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: [dehr4028@gmail.com](mailto:dehr4028@gmail.com)

### **RESUMEN**

Los bosques secos tropicales albergan una diversidad de especies vegetales, entre las que se encuentran las bromelias constituyendo un componente esencial del ecosistema, desafortunadamente sus especies se están viendo afectadas por las actividades antrópicas, las bromelias cumplen un papel ecológico significativo contribuyendo al reciclaje de nutrientes y proporcionando una variedad de microhábitats a muchos macroinvertebrados, así como la asociación con microorganismos que le favorecen la fijación de elementos como el nitrógeno, el cual es esencial para su desarrollo vegetal. El objetivo de esta investigación es evaluar la diversidad de bacterias con capacidad de fijar nitrógeno asociadas a la especie *Tillandsia elongata* Kunt. y *Tillandsia flexuosa* SW. Colectadas de un fragmento de bosque seco tropical en Las Palomas Montería-Córdoba. Para el desarrollo metodológico, se obtuvieron los microorganismos de las raíces, del interior y de la superficie de las hojas, las muestras obtenidas fueron inoculándolas en medio libre de nitrógeno (Bur's). Se obtuvieron resultados satisfactorios mostrando 68 morfotipos para endófitas y 50 morfotipos para filosfera, de los cuales 44 morfotipos de endófitas y 39 de filosfera tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, los aislados presentaron densidades que variaron entre  $0,08 \times 10^{-5}$  y  $0,71 \times 10^{-2}$  UFC/mL para endófitas y  $0,33 \times 10^{-5}$  y  $0,83 \times 10^{-3}$  UFC/mL para filosfera, y dentro de los mismos se encontraron bacterias Gram positivas y Gram negativas pertenecientes a los géneros; *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* y *Proteus*. Los resultados obtenidos indican que las especies del género *Tillandsia* pertenecientes a los ecosistemas tropicales poseen la capacidad de asociarse con microorganismos que le brindan la a su huésped una serie de

beneficios relacionados a la biomasa vegetal, fijación de nitrógeno y resistencia a las diferentes condiciones que se ven enfrentadas.

**Palabras claves:** Endófitas, epifitas, Bromelias, fijación, diversidad.

## **ABSTRACT**

Tropical dry forests harbor a diversity of plant species, among which are bromeliads constituting an essential component of the ecosystem, unfortunately their species are being affected by anthropogenic activities, bromeliads play a significant ecological role by contributing to the recycling of nutrients and providing a variety of microhabitats to many macroinvertebrates, as well as the association with microorganisms that contribute with the fixation of elements such as nitrogen, which is essential for their plant development. The objective of this research is to evaluate the diversity of bacteria with the capacity to fix nitrogen associated with two species of the genus *Tillandsia* (L.). Collected from a fragment of tropical dry forest in Las Palomas Montería. For the methodological development, the microorganisms were obtained from roots, inner and surface of the leaves, the samples obtained were inoculated in a nitrogen-free medium (Bur's). Satisfactory results were obtained showing 68 morphotypes for endophytes and 50 morphotypes for phyllosphere, of which 44 morphotypes for endophytes and 39 for phyllosphere have the capacity to fix atmospheric nitrogen, the isolates presented densities that varied between  $0.08 \times 10^{-5}$  and  $0.71 \times 10^{-2}$  CFU/mL for endophytes and  $0.33 \times 10^{-5}$  and  $0.83 \times 10^{-3}$  CFU/mL for phyllosphere, and within them were found Gram positive and Gram negative bacteria belonging to the genera; *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* and *Proteus*. In the same way, 9 fungal morphotypes were found that had the ability to fix nitrogen. The results obtained indicate that species of the genus *Tillandsia* belonging to tropical ecosystems have the ability to associate with microorganisms that provide their host with a series of benefits related to plant biomass, nitrogen fixation and resistance to the different conditions that are faced.

Key words: Endophytes, epiphytes, Bromeliads, fixation, diversity.

## **INTRODUCCIÓN**

El bosque seco tropical (bs-T) está distribuido en todo el trópico, marcado por una fuerte estacionalidad de lluvias en donde se da una época seca (menos de 100 mm de lluvia) 4 a 6

meses del año. Esta estacionalidad ha hecho que se presente una serie de adaptaciones expresada en la morfología, fisiología y comportamiento de las plantas, animales y microorganismos, los cuales para vivir en este tipo de ecosistema representa un reto (1). De igual manera, la combinación de esta estacionalidad dada por el clima y las interacciones de los organismos que lo habitan determinan la dinámica y los servicios, de los cuales se sirven millones de personas que dependen directa o indirectamente del ecosistema, siendo igual de importante es la estabilización de sus suelos, ciclo de nutrientes, estabilidad climática e hídrica y el suministro de alimentos y madera (1). Sin embargo, el bs-T es uno de los ecosistemas más amenazados en todo el mundo y esto debido a que son frágiles a los cambios en el uso del suelo debido a las prácticas que se han venido implementando como la agricultura extensiva, la minería ilegal, la ganadería y diversas actividades antrópicas como por ejemplo la tala y quema indiscriminada, lo que hacen que este cambie su dinámica completamente.

Aunque, este ecosistema se ve afectado en gran medida, no ha dejado de ser uno de los biomas más importantes debido a que en él se pueden desarrollar un sin número de especies tanto animales como vegetales, las cuales representan alto endemismos y características que hacen que sean únicas de cada región (2). Dentro de las especies que habitan este ecosistema se encuentra la familia Bromeliácea, está se encuentran distribuidas en el trópico y subtrópico de América, con una sola representación en África occidental (*Pitcairnia feliciana*), esta familia está representada por alrededor de 3600 especies descritas, de las cuales en un 60% por epífitas, las bromelias constituyen un componente esencial del ecosistema, siendo uno de los principales grupos que asocian diferentes taxones que cumplen funciones fundamentales en el medio (3). Debido a la posición de sus hojas, las cuales forman unos microhábitats que muchos autores denominan estanques, en estos la lluvia y la hojarasca que cae sobre la planta se van acumulando formando así nichos ecológicos de gran importancia para organismos que encuentran en ellos su hábitat predilecto (4), estos estanques pueden sostener cadenas tróficas complejas que involucran varios tipos de organismos, como bacterias, algas, musgos, otras plantas vasculares, protozoos, hongos, invertebrados y algunos vertebrados, por lo que sirven para desarrollo de una o varias comunidades de organismos asociados como las distintas especies de macroinvertebrados. De esta asociación biótica, las bromelias se benefician porque pueden asimilar nutrientes que provienen de la descomposición de la

hojarasca acumulada o de la muerte de los organismos asociados, mientras que los animales asociados usan la planta como refugio y el detritus acumulado les sirve como fuente de nutrientes (5).

Al tener su condición de epífita, lo cual indica que, hay plantas que crecen encima de otras, las cuales son definidas como forófitos u hospederos y son utilizados sólo como soporte, sin recibir más daño que el que pueda provocar su abundancia dentro de sus ramas; por tanto, una epífita no es una planta parásita (6), a pesar de tener esta condición las bromelias se ven afectadas en gran medida por la perturbación de su hábitat debido a que dependen de los árboles, la riqueza de estas se ven afectadas a las altas deforestaciones que se presentan en los bs-T (7). Además, se ven afectadas por los constantes cambios de temperatura lo que causa que el agua disminuya y el estrés aumente por la sequía agotando los recursos en su mayor parte, la suma de estas problemáticas ha causado que algunas especies de la familia bromeliácea, en especial las que se encuentran en uno de sus géneros más importantes como lo es genero *Tillandsia* presenten una serie de adaptaciones que le permiten vivir en el ecosistema del bs-T (7).

En este tipo de ecosistemas se dan asociaciones que brindan beneficios mutuos, como es la asociación planta-microorganismos, esta se puede dar en los diferentes estratos vegetales en donde se obtienen ventajas que favorecen su desarrollo vegetal, dichos microorganismos pueden llevar a cabo procesos como la fijación de nitrógeno, que aunque, este sea uno de los elementos con mayor porcentaje en la atmosfera estando representado en un 78%, del cual el 98,2 es nitrógeno gaseoso, 2,3 nitrógeno orgánico y un 2,5 nitrógeno fijado (8), sin embargo este no está en forma asimilable para las plantas y animales, es allí donde los microorganismos juegan su papel de gran importancia al poder facilitarle al obtención de nitrógeno a las plantas.

Asimismo, existen bacterias que tienen la capacidad de fijar nitrógeno y competir por el espacio externo e interno de la planta y en este sentido cumplen un papel antagónico, ya que también son biocontroladores inhibiendo el crecimiento de patógenos por la producción de enzimas, antibióticos y la secreción de toxinas reduciendo la población de estos, además se distinguen un grupo de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (9). Prácticamente todas las plantas están colonizadas por una diversidad de bacterias que viven en su interior sin

causarle ningún tipo de daño, todo lo contrario se ha reportado en estudios previos que estas pueden contribuir en el aumento de la biomasa vegetal y favorecer al proceso de fitorremediación a través de la acumulación de contaminantes (10), las bacterias endófitas se pueden encontrar distribuidas en toda las estructuras de la planta y esta distribución va a depender de las condiciones del hábitat donde este la especie vegetal.

La dependencia de las bacterias a las plantas va a depender de su género y su ciclo de vida, en donde se pueden encontrar facultativas u obligadas al igual esta dependencia está ligada el tipo de huésped y a su genotipo, se ha demostrado en estudios previos que las condiciones del ambiente, el tamaño de la planta, su desarrollo y su genotipo van a determinar la comunidad de bacterias y las funciones de estas en el huésped (10, 11).

Dada la importancia de las bromelias, así como el estado actual de estas en Colombia y la falta de información sobre la diversidad y función que cumplen los microorganismos asociados a estas, se hace necesario investigar sobre su ecología, interacción con microbios, la dinámica y función de estas asociaciones y su importancia en el medio, así como las habilidades para mantenerse en condiciones adversas, de tal manera, que a futuro puedan proponerse estrategias encaminadas a la conservación de estas especies vegetales. Por esta razón, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar la diversidad de bacterias con capacidad fijadora de Nitrógeno asociadas a la especie *Tillandsia elongata* Kunt. y *Tillandsia flexuosa* SW. en bosque seco tropical, corregimiento las Palomas–Montería.

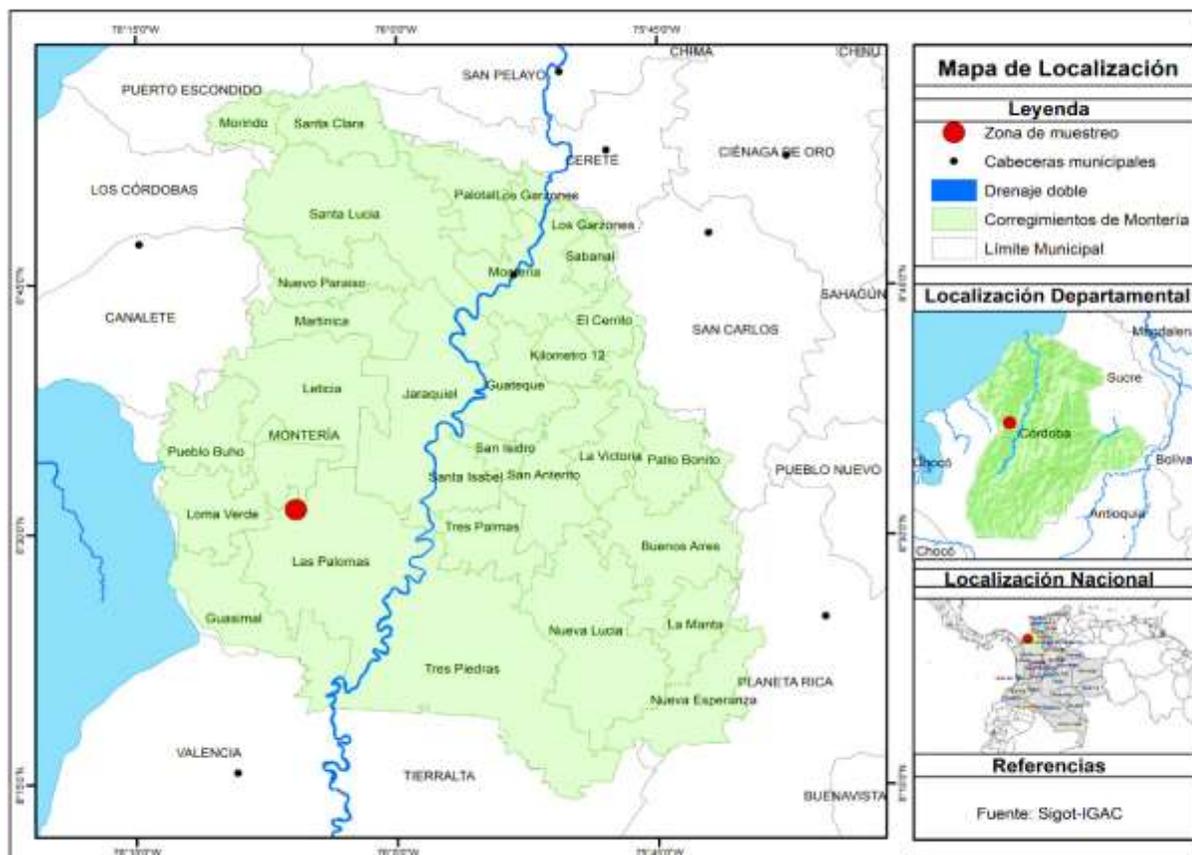
### **Materiales y métodos**

La presente investigación de tipo experimental, se llevó a cabo en dos fases, una de campo donde se reconoció la zona de muestreo y establecieron los forófitos para la recolección del material vegetal y otra de laboratorio donde se procesó las muestras y se realizaron los respectivos ensayos.

### **Identificación de la zona de muestreo**

Para establecer la zona de muestreo se realizó una salida de campo, donde se establecieron las especies del género *Tillandsia* (L.) a recolectar del fragmento de bosque seco tropical, ubicado en la hacienda Las Palmeras 8° 31' 18.83" N y 76° 06' 08.00" W, altitud de 30-40

m.s.n.m. la cual se encuentra localizada en el Corregimiento Las Palomas, perteneciente a la ciudad de Montería-Córdoba.



**Figura 1.** Zona de muestreo

### Recolección e identificación del material vegetal

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; de cada uno con ayuda de una baja rama se recolectaron 6 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. 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 obtener un total de 36 muestras procesadas: 18 muestras de hojas y 18 de raíces, aleatoriamente se tomó un individuo de cada especie para su identificación taxonómica.

Posterior a la recolección de las muestras se depositaron en bolsas selladas, y debidamente rotuladas con datos de interés (peso, estrato y árbol de donde se obtuvo) y luego trasladadas al laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Córdoba, para la identificación taxonómica se llevó una parte del material recolectado al Herbario de la Universidad de Córdoba y la otra parte se procesó para el determinar las bacterias asociadas a los diferentes tejidos vegetales.

### **Aislamiento de bacterias de la filosfera**

Del material colectado se aislaron bacterias del haz, envés y base de la hoja con la ayuda de hisopo estéril el cual se froto por las partes antes mencionadas, posterior a esto se inoculo en medio R2A y se dejó en incubación a 28°C durante 72 horas para su posterior análisis (12).

### **Desinfección superficial de los tejidos vegetales**

Después del aislamiento de las bacterias de la filosfera, el material colectado se desinfecto siguiendo la metodología establecida por Chaudhry et al., (2016) (13), con algunas modificaciones realizada el grupo de investigación, los fragmentos de las muestras se lavaron cuidadosamente con agua para retirar cualquier impureza de la superficie, seguido a esto se limpiaron con agua estéril, repitiendo este paso 3 veces, se introdujeron y agitaron en alcohol al 70% por 3 min; transcurrido este tiempo se colocaron y se agitaron en hipoclorito de sodio al 5,25% y en una gota de Tween 80 durante 1 min, seguidamente se lavaron 3 veces con agua estéril para asegurar que hayan quedado totalmente desinfectadas, para confirmar que el proceso de desinfección fue exitoso se tomó un pequeña muestra del ultimo lavado y se inoculo en una caja de Petri con medio R2A y se dejó en incubación a 28°C durante 72 horas. La ausencia del crecimiento bacteriano indico que se realizó correctamente el procedimiento.

### **Aislamientos de las bacterias endófitas**

Posterior al proceso de desinfección las muestras se trituraron en nitrógeno líquido hasta que se obtuvo una mezcla uniforme, de cada una de las mezclas se hicieron diluciones seriadas en base 10 ( $10^{-1}$  -  $10^{-5}$ ), luego se inocularon mediante la siembra en superficie en el medio

R2A y se dejaron en incubación a 28° durante 72 horas. Para estimar la densidad poblacional (UFC/mL) se realizó mediante el conteo en placa, se distinguieron y tomaron los morfotipos, para su purificación y se mantuvieron en medio R2A hasta que se le realizaron sus respectivos análisis, según la técnica establecida por Doncel y colaboradores en el 2016 (14).

### **Ensayos de fijación biológica de nitrógeno**

Para determinar la fijación biológica de nitrógeno las bacterias se sembraron en medio Burk's sugerido por Doncel (2016) (14), este medio libre de nitrógeno contiene:  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $CaSO_4$ ,  $FeCl_3$ ,  $Na_2MoO_4$  Sacarosa y agar, posterior a la siembra se incubaron durante 7 días, aguardando que haya crecimiento bacteriano lo que confirmaría que tienen capacidad de fijar nitrógeno.

### **Identificación de aislados con capacidad fijadora de nitrógeno**

Al momento de determinar las colonias aisladas con capacidad de fijar nitrógeno, se tuvieron en cuenta caracteres morfológicos macroscópicos como el color, forma, textura, elevación y tamaño de las colonias en el medio de cultivo. Posteriormente, se analizaron sus comportamientos con tinción de Gram y tinción para endoesporas; además, se realizaron pruebas bioquímicas como: crecimiento en los medios, TSI, LIA, SIM, RM/VP, Citrato de Simmons, Urea; también se realizaron pruebas para la enzima catalasa, finalmente se empleó el kit API 20 E (Biomérieux), para evaluar el perfil de fermentación de carbohidratos, según protocolo establecido por Álvarez y colaboradores (2014) (15).

### **Análisis de datos**

Se realizó un diseño completamente al azar para establecer la diferencia entre las densidades poblacionales en los estratos evaluados (bajo, medio y alto del árbol); para establecer si los datos tenían una distribución normal se usó la prueba de normalidad de Shapiro – Wilk y para establecer si los datos tenían homogeneidad de varianzas se realizó la prueba de Levene. Se realizó un ANAVA multifactorial, para determinar las relaciones entre la densidad poblacional de microorganismos en función al tipo de tejido, la especie de la planta y la posición en el forófito, Los datos fueron tabulados en Excel 2013 y analizados en el software estadístico R versión 3.2.4.

## Resultados

### Aislamiento y densidad poblacional

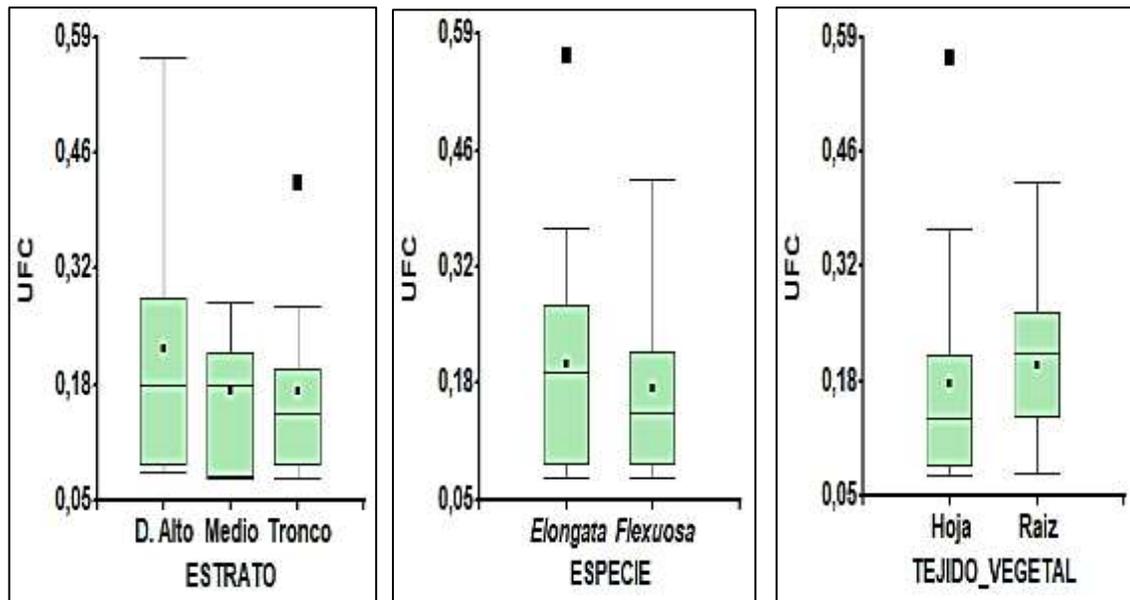
Se obtuvo un total de 378 microorganismos endófitos y 117 de la filosfera, aislados de las especies *T. elongata* y *T. flexuosa*, los cuales fueron agrupados en 68 morfotipos de bacterias endófitas y 50 morfotipos de filosfera, los aislados se nombraron de acuerdo a su ubicación en los diferentes estratos del forófito, la especie y el tejido vegetal al que pertenecían acompañado de un número.

Las densidades poblacionales de los microorganismos variaron entre  $0,08 \times 10^{-5}$  y  $0,71 \times 10^{-2}$  UFC/mL para endófitas y  $0,33 \times 10^{-5}$  y  $0,83 \times 10^{-3}$  UFC/mL para filosfera; se observó una baja densidad de endófitas en las hojas y raíces de *T. flexuosa* con relación a las hojas y raíces de *T. elongata*, sin embargo las raíces de *T. elongata* presento la mayor densidad con respecto a las demás estructuras en ambas especies, las densidades de las bacterias de la filosfera variaron presentándose una mayor densidad en el haz de las hojas de ambas especies y menor la base de su hojas, sin embargo la planta que mayor densidad presento en sus zonas evaluadas (haz, envés y base) fue *T. flexuosa*.

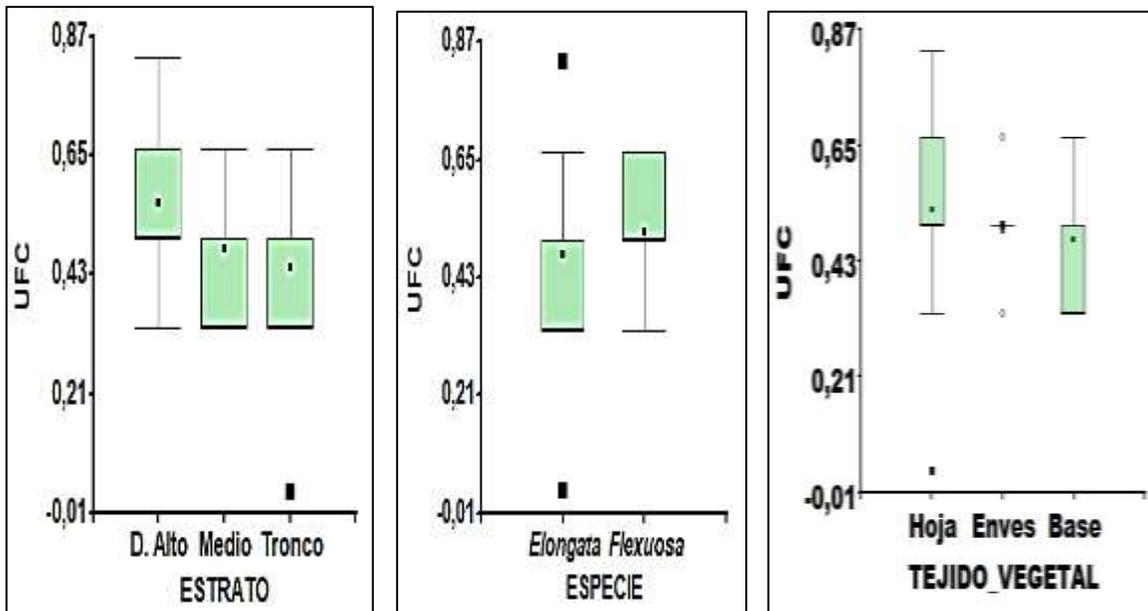
Con relación a la estratificación de la planta en el forófito, la densidad poblacional fue mayor para el estrato medio con relación al estrato alto y bajo que presentaron densidades similares para los microorganismos endófitos y comportamiento de la densidad de las bacterias de la filosfera fue mayor en el estrato alto con relación a los estratos medio y bajo donde se notó densidades similares (Figura 2 y 3).

Al realizarla prueba de Shapiro-Wilk a los microorganismos endófitos y de la filosfera, da como resultado que el p-valor calculado es mayor tanto para los endófitos ( $0.8485 > 0.05$ ) como para los de la filosfera ( $0.5554 > 0.05$ ), teniendo en cuenta un nivel de significancia de 95%, lo que establece que los residuales siguen una distribución normal, dicho de otra manera, la densidad de las bacterias endófitas y de la filosfera se comportan de una manera normal en los distintas estratos evaluados, asimismo la prueba de Levene, arroja como resultado que el p-valor es mayor para endófitos siendo de  $0.7437 > 0.05$  y  $0.2761 > 0.05$  para los de la filosfera, lo que establece que con un 95% de confianza los residuales siguen una distribución normal. El análisis multifactorial no encontró relaciones estadísticamente

significativas 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 y 2) lo que sugiere que no existen diferencias entre la densidad poblacional de los microorganismos endófitos, los de la filosfera y las diferentes variables evaluadas.



**Figura 2** Densidad poblacional de microorganismos endófitos aislados de la especie *T. elongata* y *T. flexuosa*. Estrato (alto, medio y bajo), especie (*elongata* y *flexuosa*) y tejido vegetal (hoja y raíz).

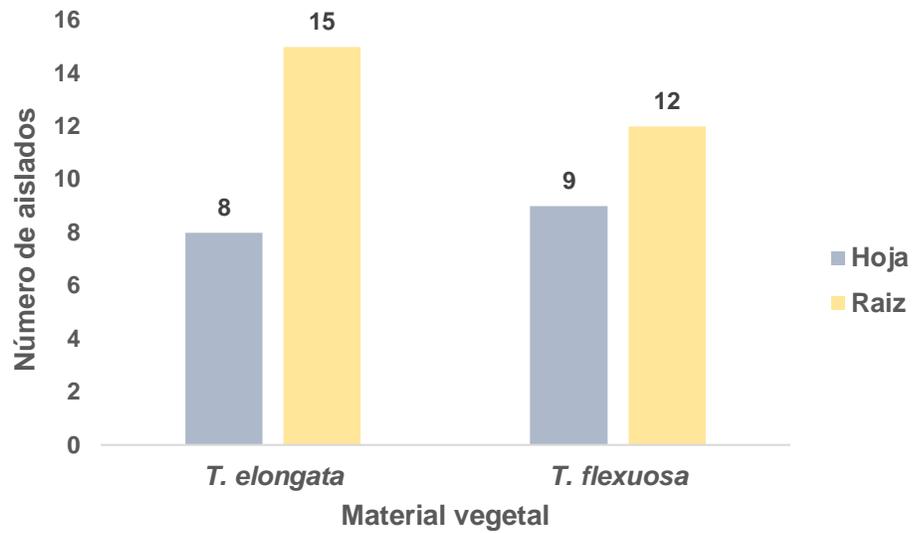


**Figura 3.** Densidad poblacional de microorganismos de la filosfera aislados de la especie *T. elongata* y *T. flexuosa*. Estrato (alto, medio y bajo), especie (*elongata* y *flexuosa*) y tejido vegetal (haz, envés y base).

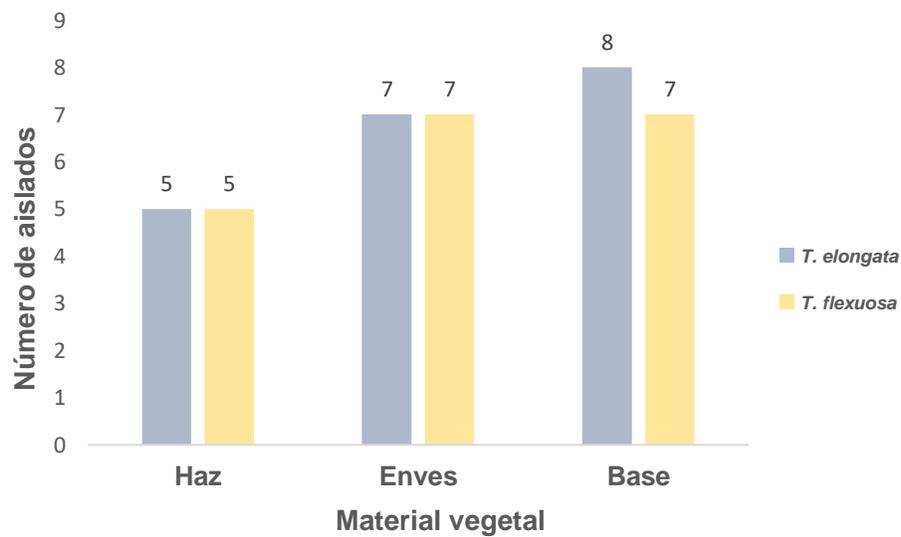
### Evaluación *in vitro* de la capacidad de fijación de Nitrógeno

Al realizar la prueba de fijación de nitrógeno a los 68 morfotipos endófitos y a los 50 de filosfera, se obtuvo que, solo 44 morfotipos endófitos y 39 de filosfera presentaron la capacidad de fijar nitrógeno *in vitro*, dado que tuvieron crecimiento en el medio libre de nitrógeno, donde a manera general, en los dos tipos de aislados (endófitos y de la filosfera) presentaron un porcentaje del 62,5% de bacterias pertenecientes al phylum Protobacterias en el cual se hallaron los géneros; *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* y *Proteus*, y el 36,2 % pertenecientes al phylum Firmicutes donde se presenciaron los géneros *Streptococcus* y *Staphylococcus*. Estas y otro pequeño porcentaje de morfotipos no identificados, fueron extraídas de las especies vegetales objeto de estudio, estas mostraron una diversidad similar, debido a que se encontró una riqueza de 23 morfotipos de *T. elongata* y 21 de *T. flexuosa* para los microorganismos endófitos y de igual manera una riqueza similar de 20 morfotipos para *T. elongata* y 19 de *T. flexuosa* para los microorganismos de la filosfera (Figura 4 y 5).

Además de bacterias aisladas se descubrieron 16 morfotipos de hongos de los cuales 9 de ellos tuvieron la facultad de crecer en el medio libre de nitrógeno.



**Figura 4.** Número de bacterias endófitas fijadoras de Nitrógeno.



**Figura 5.** Número de bacterias de la filosfera fijadoras de Nitrógeno.

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

Los microorganismos endófitos y los de la filosfera que crecieron en el medio libre de nitrógeno, mostraron características como, virajes de color amarillento a blancuzco, algunas opacas, transparentes y con una consistencia acuosa o mucoide y otras con una consistencia pastosa.

A través de la observación microscópica de las diferentes muestras obtenidas se pudo establecer que el 46,4 % de las bacterias endófitas fueron bacilos y cocos Gram positivos, el 44,1% fueron cocos y bacilos Gram negativos y solo el 9,4% cocobacilos Gram negativos, de las bacterias Gram positivas solo el 30.2% sintetizan la enzima catalasa y oxidasa y el 27.9% de las bacterias Gram negativas sintetizan la enzima catalasa y oxidasa, y el 36,36% de los bacilos Gram positivos presentaron endoesporas. Por el lado de las bacterias de la filosfera el 38.44% fueron cocos y bacilos Gram positivas, el 43.58% cocos y bacilos Gram negativas y el 17.3% fueron estafilococos Gram positivos, de las bacterias Gram positivas el 53.4% sintetizan la enzima catalasa y oxidasa y el 41.8% de las bacterias Gram negativas sintetizan la enzima catalasa y oxidasa, y el 30,76% de los bacilos Gram positivos presentaron esporas, de este entramado de microorganismos encontramos bacterias fermentadoras y no fermentadoras de las cuales un gran porcentaje de ellas tienen la capacidad de utilizar citrato como única fuente de carbono.

### **Discusión**

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

Con el análisis de los resultados de esta investigación, se pudo establecer la presencia de microorganismos endófitos y asociados a *T. elongata* y *T. flexuosa* lo que es consistente con estudios previos realizados en el departamento de Córdoba por Señalacosta (2018) (16), estos microorganismos, pueden brindarles la oportunidad de obtener nutrientes y elementos esenciales para su desarrollo, permitiéndole así la alta eficiencia de poder soportar las condiciones de estrés a las cuales se ven enfrentadas al habitar el bs-T, condiciones que están relacionadas con la falta de nutrientes, escasas hídrica, altas temperaturas y la fragmentación de su hábitat.

Existen estudios que reportan la importancia de los microorganismos asociados a plantas, ya que estos cumplen roles importantes tanto en la superficie como interior de estas, es el caso de las comunidades microbianas que poseen particularidades atribuidas a su composición, dinámica y diversidad, los cuales son importantes para describirlas y compararla en los diferentes ecosistemas que habitan, con esto lo que se da a entender es la estructura de las comunidades, su función y como se transforman espacial y temporalmente (17).

Cabe resaltar que aunque los estudios acerca de los microorganismos asociados a estas plantas son escasos, es de relevancia mencionar que según Señal acosta (2018) (16), Estrella, *et al.* (2019) (18), Krömer, *et al.* (2014) (7), en sus estudios previos establecen que las plantas de este género tienen estructuras especializadas (tricomas, pelos o estomas) debido a las adaptaciones que estas han presentado, en dichas estructuras se pueden establecer microorganismos que van desde la filosfera hasta su interior, así como lo referido por Ruiz, *et al.* (2016) (19), en su estudio de la diversidad funcional de las bacterias de la filosfera, en donde establecen que la superficie de las plantas (tallo, hojas, raíces) son las primeras zonas donde se albergan los microorganismos, que posterior ingresan a la planta por heridas, raíces y las estructuras especializadas antes mencionadas, esto le confiere una ventaja a las especies del género *Tillandsia* debido que al asociarse con ciertos microorganismos pueden adaptarse a las diferentes condiciones a las que se ven sometida.

Al evaluar la densidad poblacional de los microorganismos se pudo ver que estas no presentaron diferencias significativas en los estratos evaluados tanto en los endófitos como los de la filosfera, resultando contrastante con la literatura ya que según Ortiz, *et al.* (2018) (20), la densidad de las bacterias asociadas a las especies vegetales depende de diversos factores abióticos (localización geográfica del forófito y de la epífita en este, pH, régimen de agua), bióticos (el tipo de especie vegetal) y que estos se adaptan a las diversidad de compuestos químicos de dichas especies, lo que va a causar que poblaciones de bacterias sean diferentes en cada zona evaluada de la planta.

Cabe resaltar que otros factores pueden influenciar en la densidad poblacional, factores que están relacionados con los abióticos, como lo son la estacionalidad climática a las cuales las plantas deben responder con cambios fisiológicos, especialmente en época donde el recurso hídrico es escaso en los ecosistemas tropicales, mencionando que las muestras vegetales

fueron recolectadas en época seca, y donde investigaciones como la de Señal acosta (2018) (16), tuvo resultados similares relacionándolo a que en esta época los árboles presentan la capacidad caducifolia, para evitar el gasto de energía y así sobrevivir durante la sequía, lo que va afectar en cierta medida a las epifitas que se encuentran en el dosel alto y medio induciéndole a condiciones similares, lo que causaría que la microbiota sea semejante en las zonas evaluadas, caso contrario ocurriría en época de lluvia donde las condiciones son más óptimas y los diferentes estratos no son tan similares.

Aun cuando no se presentaron diferencias significativas, la densidad presentó variaciones en cuanto a las zonas evaluadas, presentándose menor en el dosel alto para endófitos y dosel medio para los de la filosfera, donde según Sánchez (2016) (21), el establecimiento de las bacterias en las plantas está dada por la naturaleza de los suelos y su cercanía a este, además de los exudados de las raíces los cuales establecen y modifican función de las poblaciones microbianas, por lo cual se induce que las especies vegetales que están en el dosel alto tengan menor densidad, por el lado de las bacterias de la filosfera no se logra establecer relación con estratos evaluados ya que estas constantemente estas expuestas a los cambios de temperatura lo que impone una presión selectiva sobre la microbiota asociada a las hojas, más sin embargo estos no dejan de ser unos nichos donde las esporas o propágulos se pueden desarrollar y establecer su composición, y de la misma manera interactuar con la planta hospedera Ruiz, *et al.* (2016) (19). A pesar de esto se infiere que el estrato medio para la filosfera presentó una variación mayor debido a que la superficie de las hojas no estaban tan secas como la de los otros estratos, lo que crea un microbioma más apto para su desarrollo.

De la misma manera que no se observó diferencia significativa en la densidad poblacional de los microorganismos para los estratos evaluados, tampoco se evidenció para los tejidos vegetales (hoja y raíz), no obstante trabajos como los de López, *et al.* (2015) (22), Sánchez (2016) (21), establecen que las raíces albergan más microorganismos, ya que estos ejercen a través de exudados la selección de bacterias y que además esta es la primera entrada por donde se establece la asociación planta-bacterias, del mismo modo Delgado y Suyón (2017) (23), aseguran que el primer acercamiento de la bacteria a la raíz se da por quimiotaxis, la bacteria se posa y multiplica formando las colonias que posterior a esto pasará al interior de la planta a través de la liberación de enzimas hidrolíticas, estas pueden colonizar espacios

intercelulares, quedarse en espacios específicos o moverse por las diferentes estructuras de la planta realizando un establecimiento sistémico por el sistema vascular o el apoplasto. Las bacterias de la filosfera no presentaron diferencias significativas en la densidad en las zonas que fueron evaluadas (haz, envés y base), esto según Barrera (2016) (24), se debe a que la filosfera es un microbioma pobre en nutrientes, propenso a constantes cambios de temperatura, humedad y radiación UV, lo que va a incidir en el establecimiento de las poblaciones microbianas, teniendo en cuenta estas teorías se puede entender el porqué de los resultados de la densidad difieran en los tejidos (hoja y raíz) y zonas de la filosfera; de igual forma con estas afirmaciones se puede inferir la similaridad de la densidad poblacional de las zonas antes mencionadas, puesto que las raíces de las especies vegetales evaluadas no tienen contacto directo con el suelo, sino con un suelo aéreo formado por detritus y humus que al igual está en contacto con las hojas, ya que estas no presentan un tallo prolongado lo que establece una proximidad entre las raíces y las hojas.

Así como la estratificación de las plantas en el forófito y los tejidos, hay otras condiciones que pueden establecer los nichos para que la comunidad microbiana constituya su hábitat, entre estas cabe mencionar la edad, la intensidad lumínica, estado de la planta, la posición de sus hojas, proporcionándole un microbioma único con diferentes características, Muñoz (2017) (25), menciona que la cantidad y calidad de los nichos de las bacterias se debe a varios causas asociados a factores físico-químicos, cantidad de agua y la variabilidad genética de las plantas, lo que puede o no favorecer la reorganización de estos, además de ello los microorganismos pueden ser susceptibles a los cambios del ambiente lo que establece el estado de la planta.

Otra de las razones de que la densidad poblacional de los microorganismos, no presentaron diferencias significativas entre las plantas evaluadas, es que *T. elongata* y *T. flexuosa* se encontraban en el mismo hábitat y compartiendo el mismo hospedero, estando una al lado de la otra y en las mismas condiciones climáticas, lo que coincide con lo mencionado anteriormente por Ortiz, *et al.* (2018) (20), el cual establece que los factores bióticos y abióticos, los exudados de a raíz, la interacción planta-microbio y dinámica de la planta en el medio condicionan la formación del conglomerado bacteriano en la especie vegetal de manera interna y externa.

### **Evaluación *in vitro* de la capacidad de fijación de Nitrógeno.**

En cuanto a la capacidad fijadora de nitrógeno se encontraron 6 géneros de bacterias, los cuales hacen parte de los phylum proteobacterias y firmicutes, entre estos *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Staphylococcus* han sido reportados por Delgado y Suyón (2017) (23), y Muñoz (2017) (25), en sus investigaciones identificaron estos microorganismos los cuales estaban asociados a la superficie e interior de las plantas cumpliendo funciones asociadas al desarrollo de la especie vegetal, además de estos estudios este tipo de microorganismos han sido relacionados con plantas de importancia en la industria comercial, siendo así encontradas en caña de azúcar Roa (2017) (26), en plátano Díaz (2016) (27), en papa Ortuño, *et al.* (2018) (28), en el Arándano azul Ortiz, *et al.* (2018) (20) y en plantas como guayacanes Sánchez (2016) (21), siendo estos últimos característico de las zonas secas tropicales. Esto demuestra que las bacterias se pueden asociar a gran variedad de plantas, las cuales además de servirle como hospedero también le pueden brindar sustancias como exudados que van a fin con cada microorganismo, ya que no todas bacterias no la capacidad de hidrolizar estas sustancias, este tipo de asociación se decía que se establecía de manera interna y en zonas que estuvieran cerca del suelo como las raíces, ya que en esta es donde se podía encontrar la mayor cantidad de la microbiota, hoy día se ha establecido las plantas pueden brindarle múltiples zonas que van desde la raíz hasta las hojas y que se pueden establecer de manera interna y externa.

Ahora bien los microorganismos asociados a la familia Bromeliácea, han sido reportados por Señal acosta (2018) (16), en donde establece que en las plantas del género *Tillandsia* en zonas secas tropicales se encuentran bacterias que presentan la capacidad *in vitro* de fijar nitrógeno y que estas se pueden encontrar en raíz y hojas de manera interna, entre las bacterias que encontró se mencionan *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Bacillus* entre otras, bacterias reconocidas por su eficiencia en la fijación de nitrógeno. Las mismas plantas que han sido objeto de esta investigación y donde se han encontrado resultados variados en cuanto a los microorganismos, si bien sabemos los ecosistemas tropicales tienen características típicas de cada zona y con estos resultados se corrobora lo dicho, en donde la zona de estudio puede influir de cierta manera que las bacterias no fuesen las mismas siendo que los estudios se hicieron en bosque seco tropical, pero en diferentes zonas del departamento de Córdoba.

De las bacterias aisladas se encontraron Gram negativas y Gram positivas en porcentajes variados los cuales se asemejan a los reportados por Roa (2017) (26) y Rojas y Valencia (2018) (29), donde sus características morfológicas coincidían con nuestros resultados, además de ello reportan bacilos cortos, otros alargados y esporulados particularidad que los hace resistente para adaptarse a las condiciones a las que se ven sometidos, más aun los que están asociados a la filosfera. Sánchez (2016) (21), revalida esta información al encontrar bacterias del género *Klebsiella* y *Bacillus* con caracteres asociados a la resistencia y adaptación a la rizosfera y filosfera, indicando también que estos microorganismos tienen la presencia del gen *nifH* lo cual le confiere la capacidad de fijar nitrógeno.

Los ecosistemas tropicales como se ha dicho tienen particularidades y características que le confieren a los organismos adaptaciones de todo tipo y esto se ve reflejado en su morfología, hábito y ecología, las especies del género *Tillandsia* no son ajenos a esas particularidades ya que se ven sometidas a épocas donde las condiciones ambientales no son las más favorables, esto explicaría el porqué de la variabilidad de las bacterias encontradas en ellas y la capacidad que están poseen para fijar elementos como el nitrógeno y potencializar la producción de metabolitos secundarios, así lo indica D' Luis, *et al.* (2017) (30), debido a que la asociación bacteria-planta mejora las condiciones de estrés a las cuales está sometida e incrementa su desarrollo, así como lo plantea también Afzal, *et al.* (2017) (31). Al establecer las asociaciones no solo con microorganismos específicos sino con una variedad de ellos las plantas pueden mejorar su crecimiento, ya que estos pueden suplir funciones derivadas de su proceso al interior y exterior de la planta, lo que concuerda con Haroim, *et al.* (2015) (32), quien establece que la asociación de organismos y microorganismos de la fitotelmata y espacios internos pueden aumentar la absorción de nutrientes especialmente en entornos que son carentes de ellos.

Un factor que es de gran relevancia es que las plantas *T. elongata* y *T. flexuosa* viven en la copa y tallo de árboles huésped lo que se conoce como hábito epifito y por ende no tienen contacto con el suelo y si un suelo aéreo formado por las partículas que arrastra el viento, lo que dificulta que estas tengan mayor cantidad de nutrientes a su disposición y lo que es más en el ecosistema de bs-T este tipo de suelo aéreo es escaso por las diferentes condiciones ambientales, a diferencia de las plantas que viven arraigadas al suelo teniendo los nutrientes

y microorganismos necesarios que potencializan su crecimiento y desarrollo como lo menciona Afzal, *et al.* (2017) (31), como ya se mencionó estos microorganismos ayudan de manera eficaz a obtener nutrientes y elementos necesarios entre ellos el nitrógeno.

Por otra parte el estudio de la asociación de microorganismos con el tipo de especies estudiadas en esta investigación han sido pocos y esto no quiere decir que no sean de importancia, por el contrario como lo menciona Krömer, *et al.*, (2014) (7), estas especies son sensibles a los cambios bruscos de temperatura y fragmentación de su habitat por lo cual las especies que logran adaptarse son muy pocas y las que lo logran es gracias al aporte de las bacterias para que estas especies vegetales vivan en el bs-T mencionado por el mismo autor. En los ecosistemas de bosques andinos y en los ecosistemas donde el agua no sea un recurso que cause estrés, el panorama es muy diferente ya que la disponibilidad de nutrientes es mucho mayor y la alta demanda de microorganismos juega un papel clave, las especies vegetales no se ven en la necesidad de grandes gastos energéticos por lo que su riqueza va a ser mucho mayor, cabe mencionar que en estos ecosistemas las bacterias también juegan un papel de igual importancia que las del bs-T, ya que estas facilitan la obtención de nutrientes en los biomas húmedos, mencionado por Triviño y Callejas (2018) (33).

Como se mencionó en apartados anteriores la asociación de bacterias se han reportado en una gran diversidad de plantas con intereses comercial, industrial y ornamental, estas se ha demostrado que producen fitohormonas como auxinas, citoquininas, giberelinas entre otras, producto de su metabolismo, incluyendo indol acético (IAA), indol butírico (IAB), producción de sideróforos, actividad ACC aminasa, solubilización de fosfatos, aumentando el aporte de hierro y otras sustancias benéficas para las plantas que las hospedan, estos reportes se han hecho en especies vegetales como plátano, papa, arroz, maíz, esparrago, caña de azúcar, fresas entre otras.

El reporte de hongos asociados a *Tillandsia* y su aporte a la fijación de nitrógeno han sido pocos, entre estos se encuentra la investigación realizada por Seña (2018) (16), quien encontró hongos endófitos con capacidad de fijar nitrógeno, sin embargo en otras plantas han sido de gran estudio, como el realizado por Sánchez (2016) (21), quien menciona que los hongos promueven el crecimiento vegetal, contribuyen en la asimilación de nutrientes y elementos como el fosforo y nitrógeno, aumentan la resistencia al estrés abiótico y a

patógenos, y dice que son uno de los microorganismos que más se encuentran en el suelo y en las raíces asociados en forma de micorriza, los cuales cumplen funciones de importancia en el desarrollo y crecimiento de las plantas.

### **Conclusión**

La amplia variedad de bacterias encontradas en las plantas estudiadas permite establecer la diversidad de microorganismos asociados y las múltiples funciones que estas pueden cumplir, así mismo refleja lo diverso que es un ecosistema tropical yendo desde lo más mínimo a lo más amplio, cada partícula, nutriente y especie hacen parte de este complejo llamado bs-T, su dinámica y funcionamiento dependen en gran medida de sus interrelaciones.

En este sentido la diversidad de bacterias asociadas a las plantas están relacionadas a géneros como *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* y *Proteus* los cuales fueron encontrados en las especies estudiadas del género *Tillandsia*, en donde se evidencia una mayor densidad de estas en las raíces de *T. elongata* con respecto a las otras estructuras de la otra especie, en relación a la filosfera se evidencio una mayor densidad en el haz con respecto a las demás zonas evaluadas, esto debido a la ubicación de la hoja y su interacción con los nutrientes circundantes en la atmosfera, por su parte la raíz va a albergar la mayor diversidad ya que es la zona inicial donde se posan las bacterias y posterior a esto es que se van a distribuir por toda las estructuras de la planta.

Al realizar la evaluación *in vitro* de la capacidad fijadora de nitrógeno se evidencio que las bacterias asociadas a las plantas presentan un alto número de microorganismos con esta capacidad, ya que 44 morfotipos de endófitos y 39 de la filosfera presentaron actividad positiva hacia la asimilación de nitrógeno, dentro de estas se observó una diversidad similar tanto para las bacterias asociadas a *T. elongata* y *T. flexuosa* debido a que estas se encontraban en condiciones ambientales iguales y compartían el mismo hospedero.

### **Agradecimientos**

La presente investigación estuvo bajo el auspicio del proyecto Diversidad funcional en fragmentos de bs-T del departamento de Córdoba: bases para la conservación y manejo de un ecosistema amenazado, a mis directores y amigos por la paciencia y apoyo en este trabajo.

## Bibliografía

1. Pizano C, García H. El bosque seco tropical en Colombia. Instituto de investigaciones de recursos biológicos.2014.
2. Londoño V, Torres A. Estructura y composición vegetal de un bosque seco tropical en regeneración en Bataclán (Cali, Colombia). Co Forestal. 2015; 18(1).71-85.
3. Neves C, Dyonisio J, Rossatto D. Host trait combinations drive abundance and canopy distribution of atmospheric bromeliad assemblages. AoB Plants. 2016; 8: 1-13.
4. Toledo T. Lluvia de bromelias en el bosque de niebla. Conabio. Biodiversitas. 2014; 117:1-6.
5. Mosquera Z, Gómez M, González M. Diversidad de macroinvertebrados acuáticos asociados con Bromeliaceae en una zona de bosque pluvial tropical, Chocó, Colombia. Rev. Biodivers. Neotrop. 2016; 6(2):147-153.
6. Vera P. Rescate y reubicación de especies epífitas como medida de conservación en un bosque húmedo tropical con bambú de montaña. Facultad de Ciencias Forestales. UNAM. 2017.
7. Krömer T, Garcia J, Toledo T. Epífitas vasculares como bioindicadoras de la calidad forestal: impacto antrópico sobre su diversidad y composición. en: Gonzáles C, Vallerino A, Pérez J, Low P. Edicion. Bioindicadores: guardianes de nuestro futuro ambiental. México: INECC. 2014; 605-623.
8. Pérez A, Tuberquia A, Amell D. Actividad *in vitro* de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos. 2014; 25(2):213-223.
9. Sánchez V. Aislamiento e identificación de bacterias con potencial de biocontrol a *Alternaria* sp., asociadas a *Solanum lycopersicum*. Bdigital.Unal. 2017.
10. Villalobos S, Parra F, Sepúlveda A, Arango B, MORA J. Colección de microorganismos edáficos y endófitos nativos para contribuir a la seguridad alimentaria nacional. Rev. Mex. Cienc. Agríc.2018; 9(1):191-202.
11. Afzal M, Khan Q, Sessitsch A. Endophytic bacteria: Prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants. Chemosphere. 2014; 117:232-242.

12. Toloza D, Lizarazo L. Microbial populations associated with the rhizosphere and phyllosphere plants of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Rev. Ciencias*. 2013; 18(2):27-38.
13. Chaudhry V, Sharma S, Bansal K, Patil P. Glimpse into the genomes of rice endophytic bacteria: diversity and distribution of firmicutes. *Frontiers in Microbiology*. 2016; 7:2115.
14. Doncel A, Chamorro L, Pérez A. Actividad in vitro de bacterias endófitas promotoras de crecimiento asociadas con pasto Colosoana en el municipio de Corozal, Sucre. *Rev Colombiana Cienc Anim*. 2016; 8:351-360.
15. Álvarez C, Osorio W, Díez M, Marín M. Caracterización bioquímica de microorganismos rizosféricos de plantas de vainilla con potencial como biofertilizantes. *Agron. Mesoam*. 2014; 25(2):225-241.
16. Señal Acosta R. Evaluación de la diversidad de bacterias endófitas fijadoras de Nitrógeno asociadas a dos especies del género *Tillandsia* en bosque seco tropical, Buenavista – Córdoba. Universidad de Córdoba. 2018.
17. Calderoli P. Análisis de las poblaciones de microorganismos fijadores de nitrógeno del suelo aplicando procedimientos metagenómicos [Lc]. Universidad Nacional de La Plata. 2016.
18. Estrella Parra E, Flores Cruz M, Blancas Flores G, D. Koch S, Alarcón Aguilar F. The *Tillandsia* genus: history, uses, chemistry, and biological activity. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*. 2019; (18): 239-264.
19. Ruiz C, Restrepo S, Zambrano M. Microbial and functional diversity within the phyllosphere of *espeletia* species in an andean high-mountain ecosystem. *Appl Environ Microbiol*. 2016; 82 (6):807–1817.
20. Ortiz-Galeana M, Hernández-Salmerón J, Valenzuela-Aragón B, De los Santos-Villalobos S, Rocha-Granados Ma. y Santoyo G. diversidad de bacterias endófitas cultivables asociadas a plantas de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. Biloxi con actividades promotoras del crecimiento vegetal. *Chilean J. Agric. Anim. Sci., ex Agro-Ciencia*. 2018; 34(2): 140-151.
21. Llacsá Sánchez L. identificación molecular de microorganismos asociados a la rizosfera y filosfera de los guayacanes (*Tabebuia chrysantha* Y *Tabebuia billbergii*)

- y evaluación de cepas aisladas en el proceso inicial de desarrollo de plántulas [Ing.]. Universidad Nacional de Tumbes. 2016.
22. Vital López L, Cruz Hernández Ma., Fernández Dávila S, Mendoza Herrera A. Diversidad bacteriana en raíces de maíz híbrido convencional y genéticamente modificado. *ΦYTON*. 2015; 84: 233-243.
  23. Delgado Soberón J, Suyón Cerna J. Bacterias endófitas y rizosféricas fijadoras de nitrógeno aisladas de *Asparagus officinalis* L. en Virú, región La Libertad y su potencial como promotoras de crecimiento en plantas. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. 2017.
  24. Barrera Berdugo S. Redes ecológicas em comunidades bacterianas da filosfera, dermosfera e rizosfera de espécies arbóreas da Mata Atlântica. Universidade de São Paulo. 2016.
  25. Benjumeda Muñoz D. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones. Universidad de Sevilla. 2017.
  26. Roa Lozano J. Caracterización bioquímica y molecular de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de caña de azúcar. Universidad Nacional de Colombia. 2017.
  27. Diaz Castillo N. Control biológico de *Chaetanaphothrips signipennis* (Bagnall, 1914) y *Frankliniella parvula* (Hood, 1925), mediante el desequilibrio de su microbiota nativa, empleando microorganismos nativos antagonistas obtenidos de la filosfera y rizosfera del banano (*Musaacuminata*), en Tumbes-Perú, 2014-2015. Universidad Nacional de Tumbes. 2016.
  28. N. Ortuño, M. Córdoba, M. Claros, J.A. Castillo. Evaluación de bacterias endófitas de papa nativa (*Solanum tuberosum* L.) y el desarrollo de un biofertilizante. *Rev Latinoamericana de la Papa*. 2017; 22 (1): 12 – 37.
  29. Rojas Gerónimo L, Valencia García A. caracterización de bacterias fijadoras de nitrógeno y su relación con suelos agrícolas en el distrito de riego de repelón, departamento del atlántico. Universidad de la Costa. 2018.
  30. D' Luis R, Luis Biol, Chamorro A, Leonardo M.Sc, Pérez C, Alexander Ph.D. Diversidad de bacterias endófitas aisladas de árbol de neem y su actividad inhibitoria contra el *Colletotrichum gloesporioides* causante de la antracnosis del ñame en el departamento de Sucre. *Rev Colombiana Cienc Anim*. 2017; 9(Supl):48-54.

31. Afzal M, Khan Q, Sessitsch A. Endophytic bacteria: Prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants. *Chemosphere*. 2014; 117:232-242.
32. Hardoim P, Van L, Berg G, Pirttilä A, Compant S, Campisano A, et al. The hidden world within plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2015; 79(3):293-320.
33. Triviño Cervera L, Callejas Gómez J. estudio de diversidad y cobertura de la brioflora epífita del tramo vial uf03 (la calera-patios), Cundinamarca Colombia. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. 2018.

## ANEXOS.

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

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,13	11	0,01	0,90	0,5538
TEJIDO_VEGETAL	4,1E-03	1	4,1E-03	0,31	0,5816
ESPECIE	0,01	1	0,01	0,49	0,4902
ESTRATO	0,02	2	0,01	0,75	0,4839
TEJIDO_VEGETAL*ESPECIE	1,8E-03	1	1,8E-03	0,14	0,7145
TEJIDO_VEGETAL*ESTRATO	0,06	2	0,03	2,42	0,1106
ESPECIE*ESTRATO	4,2E-03	2	2,1E-03	0,16	0,8553
TEJIDO_VEGETAL*ESPECIE*EST..	0,03	2	0,02	1,16	0,3308
Error	0,32	24	0,01		
Total	0,45	35			

\* Nivel de confianza del 95%

**Tabla 2.** Análisis multifactorial de densidad poblacional (UFC/mL) de bacterias de la filosfera en función a la posición de la planta en el forófito, la especie de la planta y la zona de tejido vegetal (haz, envés y base).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,41	17	0,02	1,35	0,2183
TEJIDO_VEGETAL	0,03	2	0,02	0,87	0,4287
ESPECIE	0,02	1	0,02	1,33	0,2556
ESTRATO	0,13	2	0,07	3,74	0,0334
TEJIDO_VEGETAL*ESPECIE	0,02	2	0,01	0,49	0,6190
TEJIDO_VEGETAL*ESTRATO	0,06	4	0,02	0,88	0,4880
ESPECIE*ESTRATO	0,05	2	0,02	1,35	0,2715
TEJIDO_VEGETAL*ESPECIE*EST..	0,09	4	0,02	1,31	0,2852
Error	0,64	36	0,02		
Total	1,05	53			

\* Nivel de confianza del 95%

