

COMPARACIÓN ENTRE LA ALTURA DE LA PLANTA Y LAS BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO NO SIMBIÓTICAS ASOCIADAS A LA RIZOSFERA DE FRAILEJÓN (*ESPELETIA HARTWEGIANA*.) EN DOS ÉPOCAS CLIMÁTICAS. PNNN

Natalia Loaiza¹, Daniel Ricardo Toro¹

Resumen

El frailejón *Espeletia hartwegiana*, es la única especie presente en el páramo del Ruiz, es una planta con gran éxito en el poblamiento de los páramos, siendo el arbusto emblema de este ecosistema de importancia debido a que son necesarios en la regulación, generación y almacenamiento de recursos hídricos. Por tal razón, los frailejones se constituyen como modelos ideales para la comprensión de la regeneración de comunidades paramunas. Por otra parte, considerando la importancia de los microorganismos en la estructuración del suelo y en la disponibilidad de los nutrientes como soporte para el crecimiento vegetal, se aislaron bacterias fijadoras de nitrógeno no simbiotes en el suelo rizosférico de *Espeletia hartwegiana* en dos épocas climáticas (seca y lluviosa) y se relacionaron con el tamaño de la planta, se estudió una población en la Laguna del Otún ubicada en el Parque Nacional Natural los Nevados. Para esto, se realizaron dos muestreos en dos épocas climáticas (seca y lluviosa), se tomaron muestras de la rizósfera de frailejones a diferentes alturas, las muestras obtenidas se trasladaron al laboratorio de Microbiología Aplicada de la Universidad de Caldas, se homogenizaron y se cultivaron en el medio selectivo LGI para el aislamiento e identificación por características macroscópicas y microscópicas. Posteriormente se realizó una matriz de datos en el programa Excel para organizar y relacionar la variables abundancia y riqueza con las dos épocas climáticas, se obtuvo finalmente mayor abundancia en época seca y mayor riqueza en época lluviosa, para determinar si existió relación significativa entre las variables se utilizó la regresión lineal múltiple teniendo a la abundancia como variable respuesta y la altura, riqueza y época como variables regresoras, no obstante, no se encontraron diferencias significativas entre ellas, posteriormente el índice de similitud de Jaccard fue realizado para establecer características afines en los grupos de bacterias asimbióticas fijadoras de nitrógeno, se encontró que estos grupos bacterianos presentaron gran variabilidad y dispersión y por lo tanto no presentaron similitud. Se concluye que los microorganismos fijadores de nitrógeno indicaron gran variabilidad y que no depende de la altura de la planta ni de la época climática, conllevando a establecer que las condiciones de la rizosfera estudiadas son estables dado que la zona está protegida de impactos ambientales.

Palabras clave: Asimbiótico, asociación, ecosistema de páramo, fijación de nitrógeno, microbiota, suelo

COMPARISON BETWEEN PLANT HEIGHT AND NON-SYMBIOTIC NITROGEN-FIXING BACTERIA ASSOCIATED WITH THE RHIZOSPHERE OF FRAILEJON (ESPELETIA HARTWEGIANA.) IN TWO CLIMATIC EPOCHS. PNNN

Abstract

The frailejon *Espeletia hartwegiana*, the only species present in the páramo del Ruiz, is a plant with great success in the population of the paramos, being the emblematic shrub of this important ecosystem because they are necessary in the regulation, generation and storage of water resources. For this reason, frailejones are ideal models for understanding the regeneration of paramo communities. On the other hand, considering the importance of microorganisms in soil structuring and in the availability of nutrients as support for plant growth, non-symbiont nitrogen-fixing bacteria were isolated in the rhizospheric soil of *Espeletia hartwegiana* in two climatic periods (dry and rainy) and were related to the size of the plant, a population was studied in the Otún Lagoon located in the Los Nevados National Natural Park. Samples were taken from the rhizosphere of frailejones at different heights. The samples obtained were taken to the Applied Microbiology laboratory of the University of Caldas, homogenized and cultured on LGI selective medium for isolation and identification by macroscopic and microscopic characteristics. Subsequently, a data matrix was made in the Excel program to organize and relate the abundance and richness variables with the two climatic epochs; greater abundance was obtained in the dry season and greater richness in the rainy season; to determine if there was a significant relationship between the variables, multiple linear regression was used, with abundance as the response variable and height, Finally, Jaccard's similarity index was used to establish similar characteristics in the groups of asymbiotic nitrogen-fixing bacteria, it was found that these bacterial groups presented great variability and dispersion and therefore did not present similarity. It is concluded that the nitrogen-fixing microorganisms showed great variability and that it does not depend on the height of the plant or the climatic season, leading to establish that the rhizosphere conditions studied are stable given that the area is protected from environmental impacts.

Keywords: Asymbiotic, association, paramo ecosystem, nitrogen fixation, microbiota, soil

¹ Semillero en investigación en Microbiología Ambiental –SIMA-, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Caldas, Manizales, Caldas, Colombia

INTRODUCCIÓN

Los páramos son ecosistemas de gran riqueza ecológica y, a su vez, juegan un importante papel en la economía de sociedades andinas por su valor agrícola e hídrico (DÍAZ *et al.*, 2005). Prestan a la sociedad servicios ambientales como la provisión continua de agua, regulación hidrológica, estabilidad de suelos, mantenimiento de la biodiversidad, almacenamiento de carbono, valor paisajístico y cultural (AVELLANEDA & TORRES, 2015). Su función principal como reguladores y abastecedores de agua es gracias a sus componentes bióticos como los frailejones, que pueden captar y secuestrar el agua de rocío y a sus componentes abióticos como bajas temperaturas y la estructura del suelo que retrasan la evaporación del agua (GÓNZALEZ, 2012). Los frailejones más que cualquier otro grupo de plantas simbolizan y caracterizan el páramo, pues constituye uno de los componentes principales en las comunidades de alta montaña (VARGAS, 2016).

Colombia es uno de los países que posee la mayor área de páramos en los andes tropicales con cerca de 1.925.410 ha (HERNÁNDEZ, 2019), de las cuales el 38,7% se encuentran en áreas de Parques Nacionales Naturales (HERNÁNDEZ & LIZARAZO, 2015).

El Parque Nacional Natural los Nevados cuenta con una extensión de 60.420 hectáreas y alturas que van desde los 2.600 hasta los 5.321 metros sobre el nivel del mar. (CUENCA, n.d.). Además, posee un sistema de humedales ubicados en la parte alta de la cuenca del río Otún, que incluye lagunas, pantanos y turberas de diferentes tamaños. Entre ellas están la laguna verde y la laguna del Otún (CUENCA, n.d.). En la laguna del Otún y su vegetación circundante se encuentran especies como la plegadera (*Lachenilla orbiculata*), Paja de Páramo (*Calamagrostis effusa*), Chilco (*Bracharis genestoides*) y Frailejón (*Espeletia hartwegiana*) principalmente (GIL *et al.*, 2010).

A pesar de la gran importancia que reciben estos ambientes, los páramos han estado sujetos a transformaciones de su paisaje debido a acciones de agroecosistemas, quemas de vegetación para la regeneración de pastos para ganado y por la ocupación antrópica (ERASO & AMARILLO, 2016). Entre estos factores tanto naturales como antrópicos, se destaca la quema (BELTRÁN & LIZARAZO, 2013). Si bien, uno de estos eventos ocurrió en el parque Nacional Natural los Nevados en el año 2006 (DELGADO & MORENO, 2010). Esto implicó un gran cambio en gran parte de estos suelos a nivel biológico (macro y micro fauna y vegetación) especialmente en la laguna del Otún, junto con factores como cambios climáticos y la deforestación, hacen que los recursos hídricos disminuyan, afectando no sólo a la fauna sino también a los pobladores que habitan allí cerca (FORERO & PÉREZ, 2010).

Estos disturbios ecológicos como los incendios, afectaron finalmente las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo que son en sí determinadas en gran medida por los microorganismos implicados en el ciclado de nutrientes (BELTRÁN & LIZARAZO, 2013) y que son indispensables para el desarrollo de la biomasa vegetal (DELGADO & MORENO, 2010). Como consecuencia, en los frailejones muestran una mayor mortalidad después de las quemas porque los adultos no alcanzan a ser reemplazados por los pequeños, esto debido al lento crecimiento de estas especies. La mortalidad aumenta con la altura y aumenta el doble en la edad adulta (VARGAS, 2016)

Así, el suelo, su microbiota y el papel que ésta desempeña en un ecosistema tan estratégico para la generación de agua ha sido poco investigado (LIZARAZO & GÓMEZ, 2015). Los pocos estudios realizados, se han enfocado en bacterias heterótrofas y oligotróficas del suelo provenientes del Páramo de La Cortadera (HERNÁNDEZ & LIZARAZO, 2015), hongos endófitos en *Espeletia argentea* (bonpl.) en el PNN Chingaza (GÓNZALEZ, 2012), microbiota rizosférica de *Espeletia spp* de los páramos de Santa Inés y de Frontino-Urao (LIZARAZO & GÓMEZ, 2015), respuesta de plantas nativas en vivero de rizobacterias aisladas ante inoculación en el Páramo de Rabanal (HERNÁNDEZ, 2019) y bacterias diazotróficas en el páramo de Guerrero (Cundinamarca) (MORATTO, *et al.*, 2005). Para el Parque Nacional Natural los Nevados, se han realizado estudios como el efecto de la restauración activa y pasiva sobre grupos funcionales fijadores de nitrógeno libre y proteolíticas del suelo del PNN Nevados (DELGADO & MORENO, 2010) y los efectos del cultivo de papa y la ganadería sobre la diversidad microbiana del suelo en PNN (AVELLANEDA & TORRES, 2015).

Ante esta problemática, actualmente se han implementado estrategias enfocadas a la recuperación de ecosistemas degradados, donde la siembra de plantas nativas de interés ecológico es una de las iniciativas más usadas; otras se enfocan solo en las propiedades de los suelos, mientras que unas pocas están incorporando microorganismos como indicadores en procesos de recuperación de áreas degradadas y calidad de los suelos (GÁLVEZ, 2002; HERNÁNDEZ, 2019; VARGAS, 2011)

A través de los diferentes microorganismos capaces de aumentar la disponibilidad de nutrientes para las plantas se encuentran las bacterias fijadoras de nitrógeno libres o asimbióticas (BFNL), cuya función principal es de abonar de forma natural el suelo al proporcionar una forma asimilable el nitrógeno en forma de amonio (NH_4^+), el cual es luego utilizado por plantas, organismos y microorganismos que hacen parte del ciclo del nitrógeno, en donde el nitrógeno sufre una serie de transformaciones beneficiando en cada etapa a cada ser vivo que interactúa con este (MAHECHA, 2011). Estos microorganismos conocidos como “rizosféricos” pueden ser clave para mejorar la calidad del suelo, como también el desarrollo y crecimiento de la vegetación (HERNÁNDEZ, 2019), especialmente para el género *Espeletia hartwegiana* por su importante papel ecológico en la resistencia de las condiciones extremas de los páramos debido a sus caracteres

morfológicos (VARGAS, 2016) y en el mantenimiento de las funciones ecológicas de éste hace de estas plantas indispensables para la conservación (SALINAS *et al.*, 2013)

Con el presente trabajo se da a conocer las bacterias asimbióticas fijadoras de nitrógeno en la rizosfera del frailejón (*Espeletia h.*) en la laguna del Otún, contribuyendo así al conocimiento y así mismo ser una herramienta de consulta para la comunidad científica, las instituciones académicas y gubernamentales, y sectores de la sociedad interesados en la biodiversidad microbiana de los páramos colombianos y su conservación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

La Laguna del Otún está situada dentro del Parque Nacional Natural los Nevados a una elevación de 3.900 m (4°47'05" N, 75°25'00" O), en la vertiente Occidental en los Andes centrales colombianos (GIL *et al.*, 2010). La zona posee en régimen tetra estacional bimodal con dos períodos de lluvias (abril-mayo y octubre-noviembre), y dos períodos de época seca (diciembre-febrero y junio-agosto). La precipitación media anual se estima en 1096,2 mm, una temperatura media de 7,0 mínima de -1,5 y máxima de 14,8 °C. La humedad relativa se estima en promedio 82 % (DELGADO & MORENO, 2010), los suelos del Otún se caracterizan por ser drenados, profundos, con alto contenido de materia orgánica y arcillas y por presentar un pH ácido (MAHECHA, 2011).

Se realizaron dos muestreos en la Laguna del Otún en dos épocas climáticas: Temporada seca (Agosto-Septiembre) y lluviosa (Marzo-Abril). Luego se procedió a la extracción de la rizosfera de frailejón de plantas con diferentes alturas desde los 1 cm hasta los 400 cm. De cada planta muestreada se tomaron tres muestras por altura y se homogeneizaron en una bolsa. Finalmente, las muestras fueron almacenadas en bolsas de plástico estériles transportadas bajo refrigeración al laboratorio y mantenidas en estas condiciones hasta el momento del análisis.

Fase de laboratorio

Aislamiento y procesamiento de muestras

Una vez obtenidas las muestras del área de estudio, siguiendo la técnica de ARGÜELLO *et al.*, (2016), se pesaron 10 g de cada muestra de suelo con su respectiva altura, estas muestras fueron suspendidas en frascos de vidrio con 90 ml de agua peptonada y se dejaron en agitación por 24 horas a 37° C para mayor concentración de bacterias. Una vez realizado el proceso anterior, se preparó el medio selectivo agar LGI semisólido ((carente

de nitrógeno) K_2HPO_4 0.2 g/L; KH_2PO_4 0.6 g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/L; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.02 g/L; $Na_2MO_4 \cdot 2H_2O$ 0.02 g/L; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.01 g/L). El medio permite el crecimiento de estas bacterias debido a que estas bacterias no disponen de otra fuente de nitrógeno para su crecimiento, sino el presente en el aire contenido dentro del recipiente debido a que el medio de cultivo utilizado carece de este elemento (LARA, VILLALBA, & OVIEDO, 2007).

Ya preparados los medios, se extrajeron y se realizaron dos diluciones: 100 μ l y 10 μ l de cada muestra, dejando los cultivos a temperatura ambiente por 24 horas.

Recuento de microorganismos

Pasado el tiempo de incubación de las muestras en el medio LGI, se realizó el recuento de las bacterias fijadoras de nitrógeno por cada caja de petri. El recuento fue expresado en unidades formadoras de colonias (UFC) realizadas manualmente.

Posteriormente, se seleccionaron aquellas bacterias que presentaron crecimiento, morfología y coloración diferente para aislarlas en medio agar nutritivo y visualizarlas en el microscopio para determinar y analizar las características morfológicas y biológicas. Este procedimiento se realizó para las dos épocas climáticas.

Descripción de microorganismos bacterianos

En las bacterias se realizó la descripción de la morfología de las colonias teniendo en cuenta la pigmentación, forma, elevación, borde y tamaño; mediante la tinción de Gram se describió la morfología celular teniendo en cuenta la forma y disposición clasificándolos como grampositivos o gramnegativos de acuerdo con los métodos descritos en el manual de (BERGEY'S, 2000).

Análisis estadístico

La información obtenida se organizó en una base de datos en el programa Microsoft Excel, se realizó un análisis de regresión lineal múltiple aplicada con el programa MANOVA para cada grupo de bacterias teniendo la abundancia como variable respuesta, y a la altura, época y riqueza como variables regresoras, siendo el valor $P < 0.05$ significativo. Estos datos fueron posteriormente analizados y corridos en el programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 22 para determinar si presentaron relación entre la altura, riqueza y abundancia para las dos épocas climáticas.

Por otra parte se realizó un análisis de clúster para todas las alturas y las dos épocas climáticas en estudio, este método fue utilizado para establecer los grupos de bacterias asimbióticas fijadoras de nitrógeno que presentaran características similares, finalmente para determinar la similitud entre estos grupos bacterianos se usó índice de similitud de

Jaccard, el dendrograma fue realizado con el programa Past, agrupando así, los morfotipos en clusters.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La importancia de las interacciones planta-microorganismo en la estructura de los ecosistemas es ampliamente reconocida y dicha asociación es esencial para el crecimiento de cualquier especie vegetal (BELTRÁN, BERNAL, & PITA, 2017). Se determinó la relación de riqueza y abundancia con la altura del frailejón para las dos épocas climáticas seca y lluviosa en la laguna del Otún.

Abundancia

Los datos resultantes fueron variables y no presentaron relación directa. En la abundancia, la época lluviosa obtuvo mayor valor en la altura de 100-150cms y menor en 250-300 cms; en la época seca fue mayor en 250-300cms y menor en 150-200cms (Tabla 1). En promedio, la abundancia de estas bacterias asimbióticas fijadoras de nitrógeno para todas las alturas fue mayor en la época seca a diferencia de la época lluviosa que presentó menor abundancia pero mayor riqueza que en la época seca. De acuerdo al estudio realizado por DELGADO & MORENO (2010), al establecer el efecto de dos restauraciones (pasiva y activa) como el de la época climática sobre la actividad de grupos bacterianos fijadores de nitrógeno en el parque Nacional Natural los nevados, mencionan que cuando el contenido de agua es mayor en el suelo producto de las lluvias, causa la separación de agregados sellando los poros del suelo, de manera que se disminuye la concentración de oxígeno (aire), la cantidad de materia orgánica y por consiguiente los nutrientes que se encuentran en ella, además de causar fluctuaciones en la rizosfera y en la disponibilidad de nutrientes, estructura del suelo y abundancia de los microorganismos presentes en este tipo de ecosistemas (MANTILLA et al., 2009) razón por la cual la actividad de estos microorganismos se disminuyen en época de lluvia.

La abundancia de microorganismos del suelo se relaciona también con la distribución espacial de los recursos BELTRÁN *et al.*, (2017). Esto es consistente con la tendencia de los resultados encontrados en este trabajo al explicar la menor cantidad de bacterias encontradas en la época lluviosa a diferencia de la época seca. Trabajos también como el de SOTO, ZAVALA, PÉREZ, & CAMARGO, (2012) apoya lo encontrado al cuantificar poblaciones totales de bacterias y hongos asociadas a las raíces de dos especies de plantas diferentes en estudio como *Viguiera dentata* y *Ferocactus latispinus* evaluando de igual manera el efecto de estacionalidad para dos épocas climáticas (lluviosa y seca) encontraron que en ambas especies, las poblaciones de bacterias fueron mayores en la época seca que en la de lluvias, esto a que las poblaciones de microorganismos fueron afectadas diferencialmente por la especie vegetal hospedera.

Por otra parte, RAMOS & ZÚÑIGA, (2008) al evaluar la influencia de la humedad en la actividad microbiana en un suelo agrícola medida por la cuantificación de la producción de CO₂ y actividad deshidrogenasa, determinaron que a porcentajes de humedad bajos (18%), la actividad microbiana es menor esto debido a que el potencial hídrico genera una fuerte influencia sobre la actividad de estos microorganismos del suelo. O en caso contrario como el de GARRIDO, (2007) al evaluar el efecto de la época climática de lluvia y sequía sobre la población de bacterias diazotróficas y su interacción con gramíneas; establecieron que la época climática seca produjo la disminución de estas bacterias posiblemente a que las condiciones ambientales no favorecieron la producción de exudados que pudieran ser aprovechados por las poblaciones de bacterias diazotróficas presentes en la rizósfera afectando entonces la promoción del crecimiento vegetal por parte de estas bacterias diazotróficas en el departamento del Cesar. Al hablar de rizósfera también juegan un papel importante las características de las plantas y los exudados producidos (CALVO, REYMUNDO & ZÚÑIGA, 2008).

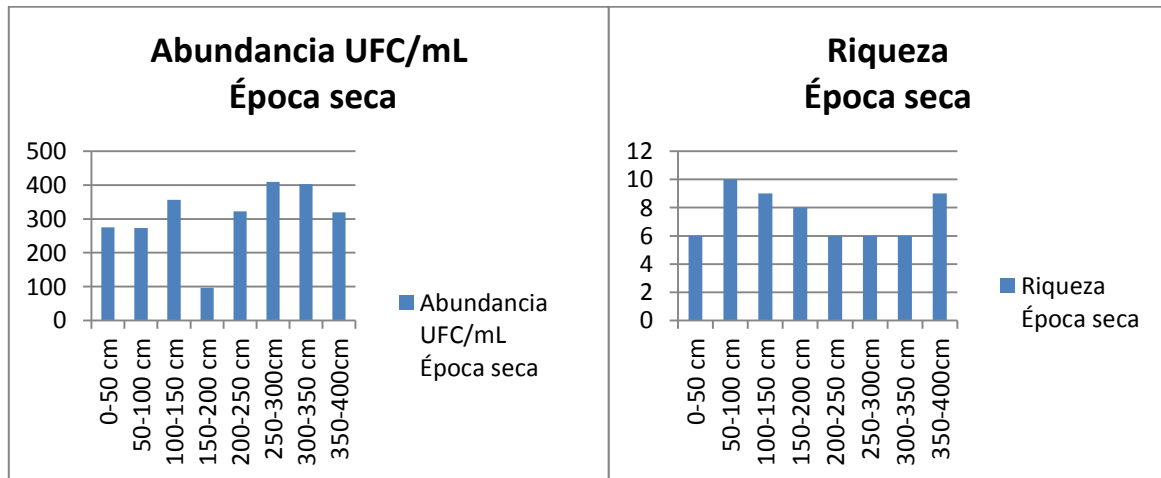
Y por último existen casos en donde las épocas climáticas lluviosa y seca no generan influencia en el crecimiento de estas bacterias del suelo como el estudio de OBANDO et al., (2010) donde evaluaron el efecto de las épocas de lluvia y sequía sobre poblaciones de microorganismos diazotróficos en *Eucalyptus spp.* Encontraron que las muestras aisladas de la rizósfera de la planta para ambas épocas climáticas no presentaron diferencias significativas, según estos autores esto pudo haber sido a la eficiencia fotosintética, las exigencias nutricionales y la resistencia a condiciones desfavorables, entre otras, que son características que están ligadas a la especie de la planta y que pueden presentar influencia en la eficiencia de fijación de nitrógeno por las bacterias asociadas a éstas. Por lo tanto se puede concluir que las épocas climáticas pueden afectar la población de bacterias fijadoras de nitrógeno dependiendo de las condiciones climáticas de la zona de estudio y de la especie de la planta en interacción con estas bacterias. En este caso, el clima de la laguna del Otún está determinado por la circulación de la atmósfera en el trópico, en un sistema bimodal de invierno y verano, y por las condiciones del relieve que determinan el cambio de las lluvias con la altura. Las precipitaciones son del orden de los 1000 a 2500 mm/año (LOTERO, 2006). De acuerdo a lo anterior, estas características pueden traer consigo modificaciones en la distribución, diversidad y abundancia de estos microorganismos.

Por otro lado, la relación de las bacterias asimbióticas fijadoras de nitrógeno con el frailejón es de vital importancia ya que el frailejón es una de las plantas más representativas y significativas de los ecosistemas de paramunos (VARGAS, 2016). En el presente trabajo, estas poblaciones de plantas están presentes en los suelos de manera natural y son componentes importantes del ciclo de nitrógeno en la laguna del Otún. La mayor abundancia de estas bacterias encontradas en alturas menores de la planta, es decir en su etapa juvenil, indica que a medida que la planta crece, la cantidad de

microorganismos disminuye esto es debido a que la mortalidad de estas plantas aumenta con la altura y aumenta el doble en la edad adulta (VARGAS, 2016). La abundancia presente de estas bacterias en la rizósfera en comparación con otros microorganismos es debido a su rápido crecimiento y la habilidad que presentan de utilizar un amplio rango de sustratos como fuentes de carbono o nitrógeno (CALVO *et al.* 2008).

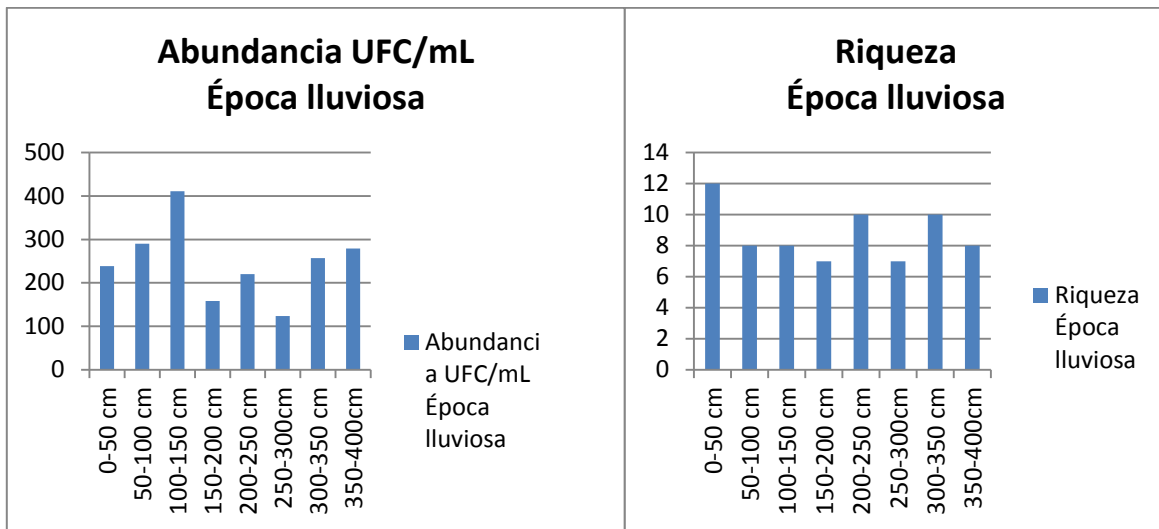
Tabla 1. Riqueza y Abundancia de bacterias fijadoras asimbióticos de nitrógeno en la rizósfera de frailejón a diferentes alturas de la planta.

ALTURA (Cm)	Riqueza Época seca	Abundancia UFC/mL Época seca	Riqueza Época lluviosa	Abundancia UFC/mL Época lluviosa
0-50 cm	6	275.5	12	238.3
50-100 cm	10	273.6	8	290.1
100-150 cm	9	356.3	8	411.1
150-200 cm	8	96.3	7	158.5
200-250 cm	6	322.1	10	220.3
250-300cm	6	409.5	7	123.8
300-350 cm	6	402.5	10	257.2
350-400cm	9	319.6	8	279.5



(a)

(b)



(c)

(d)

Figura 1. Relación de altura, riqueza y abundancia para las dos épocas climáticas. Promedio de abundancia y altura para la época seca (a), riqueza y altura para época seca (b), Promedio de abundancia y altura para la época lluviosa (c), riqueza y altura para época lluviosa (d).

Tal como se muestra en la figura 1, para las dos épocas climáticas, no se presentó relación directa en cada una de las gráficas entre las variables altura, riqueza y abundancia, esto debido a que el comportamiento de los datos generó dispersión en los valores resultantes, por lo tanto, hubo poca asociación e incorrelación en el estudio.

Riqueza

La riqueza de morfologías macroscópicas fue de mayoritariamente de bacilos gram negativos de tamaño pequeño a mediano, se observaron algunos bacilos gram positivos. Las morfologías macroscópicas fueron de colonias blancas a cremosas de borde entero y ameboide, onduladas y de elevación pulvinada. Las anteriores morfologías corresponden a microorganismos asimbióticos fijadores de nitrógeno como *Azotobacter*. Este género comprende bacterias con forma bacilar, reaccionan a la tinción de gram como gram negativos. Las colonias jóvenes de estos microorganismos son generalmente lisas, opacas, poco convexas y viscosas (JIMÉNEZ, 2007), son generalmente de color blanquecinas con bordes irregulares y finalmente de aspecto mucoide (GARCÍA, 2019).

En relación a la riqueza y los aislamientos realizados obtenidos, la diversidad de bacterias para la época climática seca presentó mayores valores en la altura de 50-100 cms con un total de 10 morfotipos y menores para las alturas 0-50 cm, 200-250 cm, 250-300 cm y 300-

350 cm un total de 6 morfotipos y para la época lluviosa, la altura de 0-50 cms con 12 morfotipos y la menor para 150-200 cm y 250-300 cm con 7 morfotipos.

La riqueza de estas bacterias se presentó mayoritariamente en la época lluviosa a diferencia de la seca. De acuerdo a lo anterior, cuando se presentaron las mayores abundancias se observó menor riqueza de morfotipos (época lluviosa) y al contrario en época seca se presentó mayor riqueza y menor abundancia. Esto es explicado mediante el principio de Gause en 1934 o exclusión competitiva en la cual las especies bacterianas coexistentes en un mismo nicho ecológico compiten por recursos limitados (debido al efecto del contenido del agua y la poca disponibilidad de nutrientes) excluyendo una a la otra dado un periodo de tiempo (PALEOLOGOS & SARANDÓN, 2014)

Por otra parte, las condiciones climatológicas de la laguna del Otún y su regulación de aguas, han permitido tener una densa cobertura vegetal protectora y una rápida meteorización del material parental de los suelos, que compensa la pérdida de estos por la actividad humana en las condiciones actuales (CHIQUITO & ZULUAGA, 2007), al ser una zona de gran cobertura vegetal, con baja intervención antrópica y con abundantes fuentes nutricionales, favorece el establecimiento y diversificación funcional de grupos de microorganismos (MANTILLA et al., 2009). Los resultados concordaron con el trabajo de MANTILLA et al., (2009) al encontrar mayor número de morfologías bacterianas en zonas de bosque del Amazonas con gran cobertura vegetal y periodos constantes de lluvia en contraste con los registros de abundancia que fueron menores con respecto a las otras coberturas evaluadas (pastizal y chagra). Esto debido al gran movimiento continuo de nutrientes que favorecieron la diversificación de estos microorganismos, lo cual es un apoyo a la explicación a la riqueza de estas bacterias fijadoras de nitrógeno en la zona de estudio.

2. Diversidad

Análisis de dendrogramas

Con las características macroscópicas y microscópicas evaluadas, se realizó el dendograma mediante el índice de jaccard, se analizaron 130 aislamientos usando un nivel de similitud del 80% del cual se aislaron finalmente 86 morfotipos asociados en 3 clusters con un 25% de similitud

Acorde al análisis del dendograma, se confirmó que la similitud de estas bacterias asimbióticas fijadoras de nitrógeno estudiadas en la Laguna del Otún fueron poco significativas, es decir que no se presentó alguna correlación que indicara semejanza conforme a las características de cada grupo de bacterias de los aislamientos realizados. Esto se relaciona con las distancias entre los grupos más cercanos por su gran variabilidad y dispersión en los datos.

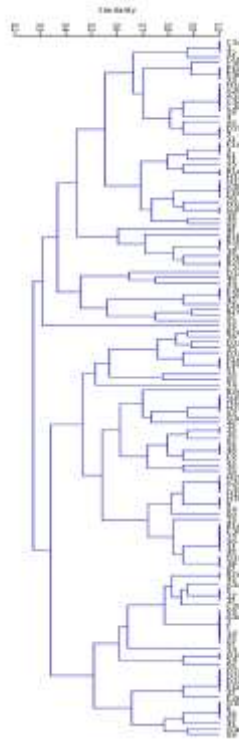


Figura 1. Dendrograma de clúster para análisis de bacterias asimbióticas fijadoras de nitrógeno en ambas épocas climáticas

3. Comparación entre diversidad y altura

Para evaluar la diversidad y la altura de la planta se realizó el análisis de regresión múltiple lineal de cada grupo de bacterias teniendo la abundancia como variable respuesta, y a la altura, la época y la riqueza como potenciales variables regresoras o cualitativas.

Los modelos de regresión para cada aislamiento se realizaron en el programa SPSS v. 22, esto con la finalidad de explorar, en cuáles de los 86 aislamientos totales se podrían evidenciar los coeficientes de regresión significativos. Se obtuvo que 4 aislamientos (H3b, B1a1, F1a, B2b) que presentaron relación alguna entre la abundancia con estas variables regresoras.

Tabla 2. Relación estadística de las variables altura, riqueza, época (regresoras) y abundancia (respuesta) con los cuatro aislamientos obtenidos que presentaron efectos significativos con las variables anteriores.

Coeficientes ^{a,b}	
Código Modelo	Coeficientes no estandarizados
	B
H3b	82940,000
	-10320,000
B1a1	18580,000
	-1830,000
F1a	1200,000
	800,000
B2b	-253,333
	53,333

De acuerdo a lo anterior, se corrieron en el programa Excel los modelos de regresión múltiple para cada uno de los cuatro aislamientos o códigos resultantes. Luego de que los datos fueron trasladados, el proceso fue repetitivo, lo que llevó a determinar las tres variables regresoras. Al modelo conjunto que no presentó significancia estadística, se eliminaron una a una las variables en estudio (aquella con un mayor valor P) y se corrió nuevamente el modelo.

El primer aislamiento denominado H3b se correlacionó la abundancia con la época, observándose que hubo una disminución con la época seca por el cambio de las dos épocas. El aislamiento B1a1 presentó una correlación directa y positiva entre la abundancia y la altura, es de resaltar que este aislamiento fue el único que presentó este comportamiento y que la abundancia de esta bacteria disminuyó con la altura. Para el aislamiento F1a, mostró una correlación entre la época y la abundancia, similar al aislamiento H3b con disminución en la época seca. Y finalmente el aislamiento B2b mostro una correlación positiva entre las variables abundancia, altura y riqueza, se encontró que a mayor altura menor riqueza y mayor abundancia.

Finalmente, el análisis indica que no existe una diferencia significativa entre la abundancia de microorganismos y la riqueza con la época del muestreo, esto demuestra que la existencia y distribución ecológica de las bacterias en un suelo específico está condicionada a diversos factores los cuales determinan su presencia o ausencia. Según

LARA, et al. (2007) Las características físicas y químicas incluyendo contenido de materia orgánica, humedad, relación carbono nitrógeno, pH, condiciones climáticas y exudados de las raíces de las plantas que sirven de nutrientes para estas poblaciones, afectan la distribución de estos microorganismos (LARA, et al. 2007); e incluso las prácticas de cultivo o la edad de la planta, ejercen efectos sobre las poblaciones microbiales (HUASASQUICHE, MORENO, & JIMÉNEZ, 2020). Esto se explica con la humedad y pH del suelo para ambas épocas climáticas en la laguna del Otún, donde la humedad fue de 39% (época seca) y 42% (época lluviosa), así como el pH que pasó de 4,51 (época lluviosa) a 4,78 (época seca).

Por otro lado, las características de los suelos del páramo, relacionadas con contenidos de aluminio y valores de pH bajos, han permitido, durante mucho tiempo, la adaptabilidad de especies vegetales, los cuales, reflejan las condiciones naturales de éste ecosistema y, por esta condición, se hace más frágil, una vez es intervenido y pierde sus características naturales (VARGAS, 2006). La laguna del Otún, presenta pH ácidos (pH 4.5-4.6), con baja saturación de bases, niveles altos a medios de materia orgánica y pobres en fósforo y potasio y de fertilidad baja (LOTERO, 2006). Estos valores pueden estar relacionados con el porcentaje de materia orgánica, ya que la cantidad de carbono en un suelo está vinculada con la actividad metabólica microbiana presente (MAHECHA, 2011). Por otra parte, la humedad ejerce una fuerte influencia sobre el proceso de desarrollo y actividad de estos microorganismos (MAHECHA, 2011). Y finalmente el efecto de la cobertura vegetal de bosque maduro en la Laguna del Otún conserva estables las condiciones del suelo.

Al ser la rizósfera una zona de interacción con la planta, los microorganismos encuentran en ella un ambiente favorable con nutrientes orgánicos provenientes de las raíces, y esto conlleva a que la concentración de microorganismos en la rizósfera generalmente sea mucho mayor que en el resto del suelo (HUASASQUICHE et al., 2020) esto se puede deber a los altos niveles de nutrientes que se hallan en la zona que rodea a las raíces y que permiten el desarrollo de poblaciones microbianas (CALVO, et al., 2008)

CONCLUSIONES

- No se encontró una relación significativa entre la abundancia y la riqueza con la altura de *Espeletia h.* en ambas épocas climáticas sobre las bacterias asimbióticas fijadoras de nitrógeno
- La abundancia de bacterias asimbióticas fijadoras de nitrógeno fue mayor en la época seca mientras que la riqueza fue mayor en época lluviosa, esto influido por el contenido de agua en el suelo y la variación del pH

- No se presentó similitud entre los aislamientos bacterianos y la altura en las dos épocas climáticas
- De los 86 morfotipos aislados, sólo 4 aislamientos bacterianos presentaron variaciones entre la abundancia con la riqueza, la altura y la época climática por lo cual estas especies son sensibles frente a variaciones frente a humedad y pH
- Al evaluar la diversidad y abundancia de bacterias asimbióticas fijadoras de nitrógeno microbiana del suelo de *Espeletia hartwegiana*, brinda información acerca del comportamiento de las bacterias estudiadas en la laguna del Otún y evalúa de forma indirecta la calidad nutritiva de los suelos paramunos

Recomendaciones

- Identificar genéticamente los aislamientos realizados en este estudio, esto con el fin de permitir una precisa información y acercamiento de las especies bacterianas en la laguna del Otún en pro del mejoramiento de suelos y conservación de especies endémicas del PNN
- Realizar estudios relacionados en la implementación de estas bacterias asimbióticas fijadoras de nitrógeno en la Laguna del Otún en suelos sanos y en suelos intervenidos con el propósito de comparar y evaluar el comportamiento de estos suelos frente a la presencia de estas bacterias
- Evaluar con detalle las características físico-químicas del suelo (pH, textura, porosidad del suelo, contenido de fósforo y materia orgánica) asociándolas a las dos épocas climáticas para determinar la variación en el crecimiento y desarrollo de estas bacterias asimbióticas de nitrógeno

Bibliografía

- ARGÜELLO, A.Z., MADIEDO, N. & MORENO, L.Y., 2016.- Cuantificación de bacterias diazótroficas aisladas de suelos cacaoteros (*Theobroma cacao* L.), por la técnica de número más probable (NMP). *Rev. Colomb. Biotecno*, 18 (2): 40–47.
- AVELLANEDA, L. M. & TORRES, E., 2015.- Biodiversidad de grupos funcionales de microorganismos asociados a suelos bajo cultivo de papa, ganadería y páramo en el Parque Nacional Natural de Los Nevados, Colombia. *Biota Colombiana*, 16 (1): 78–87.
- BELTRÁN, M.E., BERNAL, A.A. & PITA, L.A., 2017.- Microorganismos funcionales en suelos con y sin revegetalización en el municipio de Villa de Leyva, Boyacá. *Colombia Forestal*, 20(2): 158–170.
- BELTRÁN, M.E. & LIZARAZO, L. M., 2013.- Grupos funcionales de microorganismos en suelos de páramo perturbados por incendios forestales. *Revista de Ciencias*, 17(2): 121–136.
- BERGEY'S. 2000. *Manual of determinative bacteriology*.
- CALVO, P., REYMUNDO, L. & ZÚÑIGA, D., 2008.- Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecología Aplicada*, 7 (1): 1–8.
- CUENCA, A.R., SF.,- Parque Nacional Natural Los Nevados: Escenario para la enseñanza de la conservación de los ecosistemas de páramo dirigido hacia la educación ambiental no formal: Tesis, Universidad del Valle, Instituto de Educación y pedagogía, Cali.
- CHIQUITO, S. & ZULUAGA, A. C., (2007). Plan de acción ambiental vereda el bosque cuenca alta del río Otún: Tesis, Universidad tecnológica de Pereira, Facultad de Ciencias Ambientales, Pereira.
- DELGADO, D.C. & MORENO, G.S., 2010.- Efecto de dos tipos de restauración sobre dos grupos funcionales microbianos edáficos (PNN Los Nevados, Pereira, Risaralda): Tesis, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá.
- DÍAZ, M.A., NAVARRETE, J.D. & SUÁREZ, T., 2005.- Páramos: Hidrosistemas sensibles. *Revista de Ingeniería* : 64–75.
- ERASO, L.P & AMARILLO, Á.R., 2016.- Artrópofauna en necromasa de dos especies de frailejones en diferentes estados sucesionales de Páramo Andino. *Revista Colombiana de Entomología*, 42 (1): 81–90.
- FORERO, L.F. & PÉREZ, L.S., 2010.- Efecto de la restauración vegetal sobre bacterias

- solubilizadoras de fósforo y potasio (PNN Los Nevados): Tesis, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá.
- GÁLVEZ, J., 2002.- La Restauración Ecológica: Conceptos y Aplicaciones: Revisión bibliográfica, Universidad Rafael Landívar, Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas, Guatemala.
- GARCÍA, D., 2019.- Aislamiento y caracterización de cepas de *Azotobacter* spp. y el efecto de la sobreexpresión de los sRNA: RsmZ1 y RsmZ6 sobre la producción de alginato: Tesis, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de ciencias Biológicas, México.
- GARRIDO, M. F., 2007.- Aislamiento e identificación de bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas asociadas a suelos y Pastos del Valle y Sabana del Cesar en dos épocas climáticas: Tesis, Universidad Militar Nueva Granada, Facultad de Ciencias, Bogotá
- GIL, R.F., BEDOYA, F.A. & CASTAÑO, G. J., 2010.- Tendencias poblacionales en algunas especies de aves acuáticas en la Laguna del Otún entre 1998 y 2007. *Bol. Cient. Mus. Hist. Nat. U. de Caldas*, 14 (2): 92–98.
- GÓNZALEZ, D. A., 2012.- Estudio preliminar de la composición de hongos endófitos en *Espelieta Argentea* (bonpl.) en la cuenca de la quebrada Calostros (PNN Chingaza): Tesis, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de ciencias básicas, Bogotá
- HERNÁNDEZ, D.R. & LIZARAZO, L. M., 2015.- Bacterias heterótrofas y oligotróficas en zonas conservadas e intervenidas del páramo de la cortadera, Boyacá, Colombia. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 18 (2): 475–483.
- HERNÁNDEZ, D.R., 2019.- Respuesta de plantas nativas a la inoculación con rizobacterias aisladas en el páramo de Rabanal: Tesis, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Facultad de Ciencias, Tunja.
- HUASASQUICHE, L., MORENO, P. & JIMÉNEZ, J., 2020.- Caracterización y evaluación del potencial PGPR de la microflora asociada al cultivo de Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). *Ecología Aplicada*, 19 (2): 65–76.
- JIMÉNEZ, D. J., 2007.- Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter* spp. Mediante análisis de restricción del DNA ribosomal 16S: Tesis, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de ciencias básicas, Bogotá.
- LARA, C., VILLALBA, M. & OVIEDO, L. E. (2007).- Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9 (2): 6–14.

- LIZARAZO, P.X. & GÓMEZ, D., 2015.- Microbiota rizosférica de *Espeletia* spp. de los páramos de Santa Inés y de Frontino-Urrao en Antioquia, Colombia. *Acta Biol. Colomb*, 20 (1): 175–182.
- LOTERO, J. H. (2006). Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar (FIR).
- MAHECHA, S., 2011.- Comparación de la densidad y actividad bacteriana fijadora libre de nitrógeno entre tres usos de suelo (Cuenca del Otún, Risaralda): Tesis, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá.
- MANTILLA, A. J., CARDONA, G. I., PEÑA, C. P., MURCIA, U., RODRÍGUEZ, M., & ZAMBRANO, M. M. (2009). Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana. *Rev. Biol. Trop*, 57 (4): 915–927.
- MORATTO, C., MARTÍNEZ, L.J., VALENCIA, H. & SÁNCHEZ, J., 2005.- Efecto del uso del suelo sobre hongos solubilizadores de fosfato y bacterias diazotróficas en el páramo de Guerrero (Cundinamarca). *Agronomía Colombiana*, 23 (2): 299–309.
- OBANDO, D. M., BURGOS, L. B., RIVERA, D. M., RUBIANO, M. F., DIVAN, V. L. & BONILLA, R. R. 2010.- Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, Cesar (Colombia). *Acta Biol. Colomb*, 15 (3): 107–120.
- PALEOLOGOS, M. F. & SARANDÓN, S. J., 2014. Principios de ecología de poblaciones: 1-24 (en) LA PLATA (ed.) *Agroecología: bases teóricas para el diseño y manejo de agroecosistemas sustentables*, Buenos Aires
- RAMOS, E. & ZÚÑIGA, D., 2008.- Efecto de la humedad, temperatura y pH del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. *Ecología Aplicada*, 7 (1,2): 123–130.
- SALINAS, C., FUENTES, L.S. & HERNÁNDEZ, L., 2013.- Caracterización de los lepidópteros fitófagos asociados a la herbivoría de frailejones en la microcuenca de la quebrada Calostros del Parque Nacional Natural Chingaza. *Revista Mutis*, 3 (1): 1–22.
- SOTO, H. V., ZAVALA, J. A., PÉREZ, J. & CAMARGO, S. L., 2012.- Estacionalidad de bacterias y hongos en la rizósfera de dos especies de plantas en el Valle semiárido de Zapotitlán, Puebla. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3 (6): 1231–1245.
- VARGAS, O. L., 2016.- Distribución altitudinal, papel en los ecosistemas y amenazas de las poblaciones del género *Espeletia* (*Asteráceae*) en Colombia: Tesis, Universidad

Distrital Francisco José de Caldas, Facultad de Ciencias y Educación, Bogotá.

VARGAS, O., 2011.- Restauración ecológica: Biodiversidad y conservación. *Acta Biol.Colomb*, 16 (2): 221–246.