

## MICROFLORA CULTIVABLE Y ENDOMICORRIZAS OBTENIDAS EN HOJARASCA DE BOSQUE (PÁRAMO GUERRERO - FINCA PUENTE DE TIERRA) ZIPAQUIRÁ, COLOMBIA

### Cultivable Microflora and Endomycorrhizas Obtained in Litter Forest (Paramo Guerrero - Finca Puente de Tierra) Zipaquirá, Colombia

ELEONORA BERNAL, SEBASTIÁN CELIS, XIMENA GALÍNDEZ,  
CLAUDIA MORATTO, JIMENA SÁNCHEZ, DANIEL GARCÍA  
Departamento de Biología, Facultad de Ciencias,  
Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Colombia.

Presentado junio 26 de 2005, aceptado septiembre 9 de 2005, correcciones enero 13 de 2006.

#### RESUMEN

Se realizó el recuento de microorganismos cultivables (bacterias y hongos), microorganismos celulolíticos y endomicorrizas presentes en la hojarasca de bosque (finca Puente de Tierra) en el páramo Guerrero, Colombia. Los microorganismos aislados con mayor frecuencia pertenecían a los géneros *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Penicillium*, *Rhodotorula* y se aisló una cepa de *Cladosporium* sp. en un medio selectivo con carboximetil celulosa. Así mismo, se encontraron ocho morfotipos de endomicorrizas, entre los cuales predominaron especies de *Glomus* y *Acaulospora*. Este estudio contribuye con el conocimiento de la microbiota cultivable de hojarasca, que ha sido poco explorada en ecosistemas de páramo.

**Palabras clave:** hojarasca, microorganismos celulolíticos, endomicorrizas, páramo.

#### ABSTRACT

The count of cultivable microorganisms (bacteria and fungi), cellulolytic microorganisms and endomycorrhizas present in litter forest (property Puente de Tierra) in the Guerrero's moor, Colombia was made. The most frequently isolated microorganisms belonged to the *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Penicillium* and *Rhodotorula* genus and *Cladosporium* sp., which is a cellulolytic microorganism, was isolated in carboxymethyl cellulose agar. In addition eight morphotypes of endomycorrhizas were found, species of *Glomus* and *Acaulospora* predominated among them. This study contributes with the knowledge of the cultivable microorganisms of litter that have been little explored in moor ecosystems.

**Key words:** litter, cellulolytic microorganism, endomycorrhizas, moor.

## INTRODUCCIÓN

Los páramos son extensas regiones desarboladas que coronan las cordilleras por encima del bosque andino, desde los 3.800 m de altura (localmente desde los 3.200 m), hasta el nivel de nieve permanente a 4.700 m de altura (Anacona y Sabogal, 2002). Los sistemas de páramo juegan un papel importante como reguladores del recurso hídrico, albergue de un gran número de especies animales y vegetales, riqueza paisajística y procesos socioeconómicos del territorio colombiano (Castaño, 2002). Dentro de estos ecosistemas, la hojarasca constituye uno de los estratos de mayor importancia, presenta la mayor actividad de microorganismos debido a su actividad descomponedora, la cual involucra procesos físicos y químicos que reducen la hojarasca a CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y nutrientes minerales, entre los que se encuentran nitrógeno, fósforo, potasio, sodio, calcio, magnesio y azufre (Teuscher, 1965). La descomposición de la hojarasca constituye la vía de entrada principal de los nutrientes en el suelo y es uno de los puntos clave del reciclado de la materia orgánica y nutrientes (Vitousek *et al.*, 1994). Este proceso puede llevarse a cabo gracias a la intervención de muchos microorganismos que descomponen la materia orgánica del suelo y que degradan los residuos de plantas y animales a nutrientes asimilables por las plantas y otros organismos del suelo (Hatfield y Stewart, 1994), tal es el caso de algunos hongos que son particularmente importantes debido a su capacidad de degradar compuestos típicos de las plantas como celulosa, ácido húmico, xilanos, pectina, almidón, entre otros (Alexopoulos, 1985; Kjoller y Struwe, 1992), y de las micorrizas arbusculares que constituyen un puente entre la planta y el suelo para la transferencia de nutrientes (Guerrero, 1996). En este contexto, el objetivo principal de este estudio fue el aislamiento de microorganismos cultivables presentes en la hojarasca del bosque, haciendo especial énfasis en grupos funcionales de microorganismos celulolíticos y endomicorrizas, como una contribución en la búsqueda de microorganismos involucrados en la degradación de material vegetal en descomposición y en el reciclaje de nutrientes en el páramo Guerrero, (finca Puente de Tierra) Zipaquirá, Colombia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MUESTREO

El área de muestreo correspondió a una zona de bosque ubicada en el municipio de Zipaquirá, en la vereda páramo Guerrero Oriental, finca Puente de Tierra a 3373 msnm (04°08'271" N y 74°02'208" W; Conservación Internacional - CAR, 2001). Se tomaron muestras de tres sitios georreferenciados dentro del área de bosque, trazando para cada punto transectos de 2 x 2 m, dentro de los cuales se tomaron cinco muestras de hojarasca aleatoriamente y se mezclaron para la obtención de una muestra integrada de aproximadamente 300 g. Los datos de pH fueron determinados en el laboratorio de suelos del Instituto Geográfico Agustín Codazzi.

### RECUESTO DE MICROORGANISMOS CULTIVABLES

Se empleó la metodología de series de dilución y siembra en placa en superficie para conteo de células viables en *agar plate count* (Madigan *et al.*, 2000), incubando a 33 °C

durante diez días. Para la identificación de hongos y bacterias presentes en la muestra de hojarasca, se procedió a la purificación de cada uno de los morfotipos aislados. Para bacterias se efectuó siembra por agotamiento en agar nutritivo con incubación a 37 °C por 24 horas y se realizó la descripción macroscópica de las colonias, de las características microscópicas mediante tinción de Gram y tinciones diferenciales y pruebas bioquímicas de utilización de sustratos para su identificación presuntiva (Krieg y Holt, 1994). Los hongos se incubaron en agar papa dextrosa a 25 °C durante ocho días y se efectuó descripción macroscópica de las colonias y de las características microscópicas mediante montajes en fresco con azul de lactofenol para su identificación, utilizando claves taxónomicas (Domsch *et al.*, 1993).

#### **AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS**

Se empleó la técnica de series de dilución y siembra en placa en superficie para conteo de células viables (Madigan *et al.*, 2000) en medio carboximetil celulosa (Krieg y Holt, 1994), incubando durante 30 días a 25 °C.

#### **DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ENDOMICORRIZAS EN RAÍCES Y RECUESTO DE ESPORAS**

Una vez recolectadas las raíces presentes en la muestra de hojarasca, se efectuó el procedimiento de clareo y tinción para observación de estructuras infectivas según el método de Phillips y Hayman (1970). Adicionalmente se realizó la extracción de esporas del suelo de hojarasca, siguiendo la metodología de Gederman y Nicholson, con modificaciones de Sieverding (1983) por gradiente de sacarosa.

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El recuento total de microorganismos fue de  $22 \times 10^6$  UFC/g de suelo. De las colonias encontradas se aislaron nueve morfotipos de bacterias y tres morfotipos de hongos. Una vez realizadas las pruebas bioquímicas y observaciones microscópicas correspondientes, se obtuvieron cinco morfotipos de bacterias Gram positivas, de los cuales, tres fueron identificados como *Staphylococcus* sp., uno como *Bacillus* sp. y otro como *Micrococcus* sp., mientras que los cuatro morfotipos de bacterias Gram negativas encontrados pertenecieron al género *Pseudomonas*. En cuanto a los hongos aislados, se identificaron especies de los géneros *Penicillium*, *Cladosporium* y *Rhodotorula*. Estos resultados son acordes con la literatura, en donde se reporta que las bacterias aisladas en muestras de suelo con más frecuencia son *Arthrobacter* sp., *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. (Coyne, 2000). Igualmente, en otros estudios realizados en páramo, se han reportado aislamientos de los géneros *Pseudomonas*, *Penicillium* y *Rhodotorula* asociados a rizósfera de *Espeletia grandiflora* y *Calamagrostis effusa* con actividad solubilizadora de fosfatos y producción de ácido indolacético (Sánchez *et al.*, 2005). Es posible que la hojarasca muestreada se encuentre en la fase rápida de descomposición, puesto que algunos de los microorganismos aislados (como *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp.) corresponden a grupos propios de esta fase, en tanto que organismos de la fase lenta de descomposición como actinomicetes y organismos celulolíticos se presentaron en pequeñas proporciones o fueron de crecimiento lento. Para estos últimos, se observó crecimiento de las primeras colonias al cabo de 20 días, obteniendo únicamente

aislamientos de *Cladosporium* sp., el cual posee una reconocida actividad celulolítica (Torres et al., 2004). Cabe anotar que a diferencia de estos resultados, en estudios realizados en Colombia en el páramo El Granizo relacionados con la distribución de hongos en el abrigo de hojas muertas y en sistema suelo - planta de *E. grandiflora*, *Cladosporium* sp. no fue encontrado en la necromasa, sino en el suelo como saprófito (Anacona et al., 2005; Garcés et al., 2005). Así mismo, su presencia en el suelo y en la hojarasca de bosque puede estar relacionada con su capacidad de solubilizar fosfatos, que también ha sido reportada (Gualdrón et al., 1997; Cepeda et al., 2005). Por su parte, no se encontraron cantidades representativas de actinomycetes en las muestras analizadas y aunque estos microorganismos han sido reportados como parte de la microflora de hojarasca, la baja proporción encontrada en este estudio puede estar relacionada con la fase de descomposición del material muestreado, ya que estos microorganismos son típicos de la fase lenta de descomposición de hojarasca (Torres et al., 2004).

Las interacciones entre micorizas y microorganismos del suelo son determinantes para los ciclos de nutrientes en un ecosistema, afectando el balance entre procesos saprofiticos, patogénicos y simbióticos en el medio ambiente edáfico (Guerrero, 1996) y en la hojarasca (Posada, 2001), además del papel que ejercen en la conservación de los suelos (Millar y Jastrow, 1992). En cuanto a las raíces analizadas, se confirmó la presencia de endomicorizas al encontrar hifas intra y extramatriciales, cuya función principal es la toma y transferencia de nutrientes del sustrato hacia la planta (Sánchez, 1999), así como vesículas, estructuras de reserva características de estos hongos. El recuento de esporas fue de 792/100 g de suelo, presentando ocho morfotipos, entre las cuales predominaron especies de los géneros *Glomus* y *Acaulospora*, los cuales presentan alta tolerancia a pH ácidos (Green et al., 1976; Coba et al., 1995), como los registrados en los suelos de bosque del páramo de Guerrero (3,4 a 4,0). La cantidad de esporas y el número de morfotipos encontrados en el suelo de hojarasca fueron menores que los reportados en otros estudios para rizósfera de *C. effusa* y *E. grandiflora* en el páramo El Granizo (García et al., 2005). Los microorganismos aislados en el presente estudio cumplen un papel importante en la dinámica de la materia orgánica y el ciclaje de nutrientes en el ecosistema. Sin embargo, es importante resaltar que por la técnica empleada solo se logró aislar una parte de los microorganismos presentes en la hojarasca, aquellos cultivables y con tolerancia a temperaturas estándar de cultivo (Nemergut et al., 2005). Para futuros estudios se recomienda complementar la información obtenida con métodos moleculares que permitan examinar la diversidad microbiana sin las limitaciones relacionadas con los métodos de cultivo tradicionales.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología por los espacios físicos y materiales facilitados. Al profesor Hernando Valencia por su apoyo académico, a Lina Caballero, Juan García y Adolfo Jara por su contribución y a Claudia Martínez del laboratorio de microbiología del suelo por su amable colaboración.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALEXOPOULUS C. Introducción a la micología. Barcelona: Editorial Omega; 1985.
- ANACONA A, SABOGAL S. Estructura espacial y estacional de la comunidad de hongos asociada al abrigo de hojas muertas de *Espeletia grandiflora* H & B en el páramo El Granizo, Cundinamarca, Colombia [trabajo de grado]. Bogotá: Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia; 2002.
- ANACONA A, SABOGAL S, GARCÉS E. Distribución de las especies de hongos asociadas al abrigo de hojas muertas de *Espeletia grandiflora*, en el páramo El Granizo. En: Bonilla M, Editor. Estrategias adaptativas de plantas del páramo y del bosque altoandino en la cordillera oriental de Colombia. Bogotá: Unibiblos; 2005. p. 107-122.
- CASTAÑO C. Páramos y ecosistemas alto andinos de Colombia en condición Hotspot & global climatic tensor. Bogotá: Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (Ideam); 2002.
- CEPEDA M, GAMBOA A, VALENCIA H, LOZANO A. Hongos solubilizadores de fosfatos minerales aislados de la rizósfera de *Espeletia grandiflora* del páramo El Granizo. En: Bonilla M, Editor. Estrategias adaptativas de plantas del páramo y del bosque altoandino en la cordillera oriental de Colombia. Bogotá: Unibiblos; 2005. p. 89-106.
- COBA B, COGUA J. Reconocimiento de MVA en el páramo y bosque altoandino en la región de Monserrate. En: Mora-Osejo, L y Sturm H. Editores. Estudios ecológicos del páramo y del bosque altoandino, Cordillera Oriental de Colombia. 2 Ed. Bogotá: Editorial Guadalupe. Academia Colombiana de Ciencias exactas, físicas y naturales, Colección Jorge Álvarez Lleras. No. 6; 1995. p. 53-405.
- CONSERVACIÓN INTERNACIONAL-CAR. Proyecto piloto para la conservación y uso sostenible del páramo de guerrero. Informe final. Bogotá; 2001.
- COYNE M. Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. Madrid: Editorial Paraninfo; 2000.
- DOMSCH K, GAMS W, ANDERSON T. Compendium of Soil Fungi. London: Academic Press; 1993.
- GARCÉS E, ANACONA A, SABOGAL S, NAVARRETE D, DÍAZ J. El sistema suelo-planta en *Espeletia grandiflora*, como un refugio para la comunidad de hongos del páramo. En: Bonilla M, Editor. Estrategias adaptativas de plantas del páramo y del bosque altoandino en la cordillera oriental de Colombia. Bogotá: Unibiblos; 2005. p. 123-131.
- GARCÍA J, GARCÍA D, CORREA M. Incidencia de micorrizas arbusculares y vesículo-arbusculares como estrategia adaptativa de plantas del páramo y del bosque altoandino. En: Bonilla M, Editor. Estrategias adaptativas de plantas del páramo y del bosque altoandino en la cordillera oriental de Colombia. Bogotá: Unibiblos; 2005. p. 53-81.
- GREEN N, GRAHAMS S, CHENCK N. The Influence of pH on the Germination of Vesicular Arbuscular *Mycorrhizal fungi*. *Phytopathol.* 1976;72:1119-1124.
- GUALDRÓN C, SUAREZ A, VALENCIA H. Hongos del suelo aislados de zonas de vegetación natural del páramo de Chisacá, Colombia. *Caldasia.* 1997;19:235-245.
- GUERRERO E. Micorriza: fundamentos biológicos y estado del arte. En: Guerrero E. Editor. Micorrizas Recurso biológico del suelo. Bogotá: Fondo FEN; 1996. p. 3-46.

HATFIELD J, STEWART B. Soil Biology: Effects on Soil Quality. Advances in Soil Science. Florida: Lewis Publishers; 1994.

KJOLLER A, STRUWE S. Functional groups of Microfungi in Decomposition. En: Carrol. G. Editor. The Fungal Community. Its Organization and Role in the Ecosystem. 2ed. New York: Marcel Dekker; 1992. p. 619-626.

KRIEG N, HOLT J, Editores. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9 ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1994.

MADIGAN M, MARTINKO J, PARKER J. Brock Biología de los microorganismos. 8 ed. Madrid: Prentice Hall; 2000.

MILLAR R, JASTROW J. The Rol of Mycorrhizal Fungi in Soil Conservation. En: Bethlenfalvay G, Linderman R, Editores. *Mycorrhizae* in Sustainable Agriculture. Special Publication No. 54, American Society of Agronomy. Wisconsin: Madison; 1992. p. 29-43.

NEMERGUT D, COSTELLO E, MEYER A, PESCADOR M, WEINTRAV M, SHMITD S. Structure and Function of Alpine and Arctic Soil Microbial Communities. Res Microbiol. 2005;156:775-784.

PHILLIPS J, HAYMAN D. Improved Procedures for Clearing Roots and Staining Parasitic and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi for Rapid Assessment of Infection. Trans Br Mycol Soc. 1970;55:158-160.

POSADA R. Presencia de propágulos de hongos de micorriza arbuscular en muestras de hojarasca alrededor de dos especies arbóreas en un bosque húmedo tropical. Acta biol Colomb. 2001;6(1)24-30.

SÁNCHEZ M. Endomicorrizas en agroecosistemas colombianos. Palmira: Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira; 1999.

SÁNCHEZ J, VALENCIA H, VALERO N. Reducción de ácido indolacético por microorganismos solubilizadores de fosfatos presentes en la rizósfera de *Espeletia grandiflora* y *Calamagrostis effusa* del páramo El Granizo. En: Bonilla M, Editor. Estrategias adaptativas de plantas del páramo y del bosque altoandino en la cordillera oriental de Colombia. Bogotá: Unibiblos; 2005. p. 177-193.

SIEVERDING E. Manual de métodos para la investigación de la micorriza vesículo-arbuscular en el laboratorio. Palmira: Centro Internacional de Agricultura Tropical, Ciat; 1983.

TEUSCHER H. El suelo y su fertilidad. México: Compañía Editorial Continental S.A.; 1965.

TORRES P, ABRIL A, BUSHER E. Microbial Succession in Litter decomposition in Semi-Arid Chaco Woodland. Soil Biol Biochem. 2004;37:49-54.

VITOUSEK P, TURNER D, PARTON W, Sanford R. Litter Decomposition on the Manua Loa Environmental Matrix, Hawaii: Patterns, Mechanisms and Models. Ecology. 1994;75:418-429.