



Bosque del Piedemonte Caquetano.

COMPOSICIÓN DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DE SUELOS DE BOSQUES HÚMEDOS TROPICALES CON DIFERENTE COMPOSICIÓN FLORÍSTICA DEL DEPARTAMENTO DE CAQUETÁ - AMAZONIA COLOMBIANA

Carolina Díaz Cárdenas^a, Gladys Inés Cardona^{b*}, Dairon Cárdenas López^c, Clara Patricia Peña Venegas^d

Microscopía electrónica de barrido en la cual se observa la presencia de diatomeas del género *Nitzschia*. Carolina Díaz Cárdenas

RESUMEN

Con este estudio se buscó describir la composición de las comunidades bacterianas dominantes del suelo de dos bosques húmedos tropicales (B1 y B2) poco intervenidos del departamento de Caquetá que presentan una composición florística diferente. La composición de la comunidad bacteriana se llevó a cabo utilizando como estrategia independiente de cultivo la generación de dos bibliotecas de clones del 16S ARNr de organismos del dominio *Bacteria* y como estrategia dependiente de cultivo la realización de medios suplementados con celulosa y xilano, dos polisacáridos derivados del componente estructural de las plantas. En los dos suelos de bosques se detectó predominio de los Fila *Acidobacteria* y *Proteobacteria* (*Alfa*, *Beta*, *Gamma* y *Delta-Proteobacteria*), seguidos de *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes* y *Chloroflexi*. Aunque no se encontraron diferencias significativas ($p = 0,18$) entre la composición de las comunidades microbianas en los suelos de B1 y B2, sí se observaron diferencias relacionadas con la presencia del Filum *Planctomycetes* el cual solo estuvo presente en B1 y con los Fila *Verrucomicrobia* y *Bacteroidetes* que solo se encontraron en B2. A su vez los enriquecimientos

de cultivo favorecieron el aislamiento de microorganismos de los géneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Burkholderia* y *Pseudomonas*, los cuales también fueron reportados en las bibliotecas de clones y se caracterizan por su importancia en los ciclos del carbono, nitrógeno y fósforo.

Palabras clave

Inventarios taxonómicos, diversidad bacteriana, bosque húmedo tropical, biblioteca de clones.

ABSTRACT

The composition of the main bacteria communities in soils from two well preserved tropical rainforest from the state of Caquetá-Colombia with different vegetation composition, were investigated using clone libraries of 16S rRNA genes and culture media amended with cellulose and xylane, two polysaccharides derived from the structural components of plants. In the two forests studied, *Bacteria* community was dominated by *Acidobacteria* and *Proteobacteria* (*Alfa*, *Beta*, *Gamma* and *Delta-Proteobacteria*), followed by *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes* and *Chloroflexi*. Although no signifi-

^a Contratista, Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas, SINCHI. diazcardenasaro@gmail.com

^b Investigadora, Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas, SINCHI. gcardona@sinchi.org.co.

^c Investigador Programa de Ecosistemas y Recursos Naturales, Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas, SINCHI. dcardenas@sinchi.org.co.

^d Investigadora, Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas, SINCHI. cpena@sinchi.org.co

cant differences ($p = 0.18$) between the composition of microbial communities in soils B1 and B2 were found, there were differences related to the presence of the phylum *Planctomycetes* which was only observed in B1 and *Verrucomicrobia* and *Bacteroidetes* which were observed only in B2. Phylogenetic analysis indicated that most of the bacterial isolates were related to the genera *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Burkholderia* and *Pseudomonas*, which are important groups in the carbon, nitrogen and phosphorous cycles.

Keywords

Taxonomic inventory, bacteria diversity, tropical rain-forest, clone library.

INTRODUCCIÓN

El departamento de Caquetá, situado al noroeste de la Amazonia colombiana, cuenta con una superficie de 88.965 km², lo cual representa un 18,7% de la Amazonia colombiana. El 29,6% son de bosque primario y 42,7% de bosque secundario (Gobernación de Caquetá, 2012).

En la actualidad los bosques de Caquetá son afectados por procesos de deforestación, debido a actividades extensivas como la ganadería, cultivos con fines agrícolas e ilícitos y la explotación de los recursos maderables sin control por parte de las autoridades competentes. Esta deforestación ha causado mayor susceptibilidad a incendios forestales, cambio climático, empobrecimiento de los suelos por la pérdida de nutrientes, pérdida de biodiversidad y cambios en la composición y estructura de comunidades microbianas del suelo (da C Jesús *et al.* 2009).

Los microorganismos al igual que la fauna y flora se encuentran expuestos a las mismas fuerzas y condiciones que amenazan actualmente su diversidad, por lo que un inventario sistemático sobre diversos puntos de la geografía nacional, específicamente en regiones poco exploradas como la Amazonía colombiana, permitirá generar pautas para la conservación y uso sostenible de este valioso recurso genético, teniendo en cuenta que los microorganismos hacen posible la conexión a manera de red de toda forma animal y

vegetal en el planeta; ya sea sirviendo a la plantas en la captura de nutrientes en sus raíces o a los animales en la descomposición interna de los alimentos. En general, la vida microbiana regula y mantiene los procesos geofisiológicos del planeta haciendo que se mantenga el balance que sostiene la biosfera. No se podrían tener bosques, páramos, sabanas y manglares y demás biomas sin la presencia de bacterias, hongos, protozoos, algas y virus los cuales conforman la diversidad microbiana (Flórez 2001).

Los inventarios biológicos de comunidades microbianas pueden realizarse usando marcadores moleculares como el gen 16S ARNr, estos marcadores permiten estimar la diversidad filogenética y documentar la distribución espacial y temporal de especies, poblaciones, comunidades u otros elementos biológicos (Kremen *et al.* 1993). Al mismo tiempo complementar estos estudios con métodos dependientes de cultivo que permitan el aislamiento de microorganismos propios de los ambientes naturales en estudio sigue siendo una herramienta útil para el estudio de la fisiología, bioquímica y genética microbiana (Ben-Dov *et al.* 2009), para confirmar observaciones de procesos ecológicos obtenidos en campo y para evaluar hipótesis originadas a partir del estudio de genomas (Giovannoni *et al.* 2007).

Estudios previos utilizando herramientas independientes de cultivo han mostrado que la composición de las comunidades bacterianas de suelos de bosques temperados y tropicales es dominada por organismos de los Fila *Acidobacteria* y *Proteobacteria* (*Alfa* (*a*), *Beta* (*b*), *Delta* (*d*) y *Gamma* (*g*)) seguido de *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes* y *Chloroflexi* (da C Jesús *et al.* 2009; Faoro *et al.* 2010). En particular en suelos de bosques de la Amazonía colombiana, el Instituto Amazónico de Investigaciones científicas-SINCHI, ha adelantado trabajos orientados a la búsqueda de microorganismos involucrados en los principales ciclos de nutrientes, utilizando herramientas tanto independientes como dependientes de cultivo. Es así como se ha reportado la caracterización de la composición de la comunidad microbiana con potencial para solubilizar fósforo bajo diferentes coberturas (bosque, pastizal, rastrojo) reportando organismos de los géneros *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Enterobacter*, *Chromobacterium* y *Chromobacterium* (Useche *et al.* 2004),

y organismos con capacidad para fijar nitrógeno atmosférico de los géneros *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Mesorhizobium*, *Pantoea*, *Paenibacillus* entre otras (Mantilla 2008). Además, se han estudiado actinomicetos y micorrizas arbusculares en suelos con diferentes grados de transformación antrópica y se ha detectado que estos grupos pueden ser indicadores de procesos de alteración del paisaje (Cardona *et al.* 2005). A pesar de los avances en describir diferentes grupos microbianos presentes en suelos de la región Amazónica aún conocer la composición, estructura y función de las comunidades microbianas en suelos de bosques de la región.

Por lo anterior, con este estudio se busca generar un inventario de las comunidades bacterianas de muestras de suelos de bosques poco intervenidos del departamento de Caquetá, utilizando métodos tanto independientes como dependientes de cultivo.

MÉTODOS

Descripción del área de estudio

El estudio se realizó en dos bosques húmedos tropicales poco intervenidos ubicados al sur occidente del departamento de Caquetá, denominados B1 y B2.

El muestreo realizado en el bosque B1 se llevó a cabo en el mes de Noviembre del 2010, en el municipio de Albania, vía Currillo (km 8), en un relicto de bosque en buen estado de conservación que presenta un paisaje de lomerío, ubicado en las coordenadas 01° 12' 45" N – 75° 52' 11.2" W a una altura de 300 m.s.n.m. El bosque presenta una altura promedio de 25 m, con diámetros a la altura de pecho (DAP) de hasta 80 cm, bajo epifitismo, sotobosque abierto y suelo con poca hojarasca.

El muestreo realizado en el bosque B2, se llevó a cabo en el mes de Abril de 2011, en el municipio de Belén de los Andaquíes, vía Aletones, en un bosque primario ubicado en las coordenadas 01° 25' 18.3" N – 75° 53' 008" W, a una altitud de 600 m.s.n.m. El bosque presenta paisaje de cordillera baja, es moderadamente perturbado con pendiente de 45°, con alta presencia de lianas, alto epifitismo, sotobosque denso y suelo

con alta presencia de hojarasca de 15-20 cm. El bosque presenta una altura media de 15 m, con DAP de hasta 40 cm

Características edáficas de suelos del Caquetá

En términos generales los suelos del Caquetá se caracterizan por presentar una textura principalmente fina, con diferentes grados de drenaje interno, un pH que fluctúa entre 4,5 y 5,8 (IGAC 1993); con una capacidad catiónica de cambio de baja a media y saturación de bases baja; presentan alto contenido o saturación de aluminio, en los horizontes minerales se presenta bajo contenido de carbón, fósforo, potasio y magnesio. Mineralógicamente predominan el cuarzo y la caolinita, elementos que no aportan nutrientes a las plantas, dando lugar a una fertilidad muy baja a ligeramente moderada (http://www.corpoamazonia.gov.co/Region/Caqueta/Caq_Natural.htm).

Descripción de la vegetación dominante

Para la caracterización de la vegetación del estrato arbóreo, se establecieron parcelas de 100 m x 10 m cada una, dividida cada 10 m, para un total de área muestreada de 0.2 ha. En cada parcela se reportaron todos los individuos cuyo DAP fuera mayor o igual a 10 cm; para cada individuo se registró el hábito de crecimiento, altura comercial, altura total, diámetro de fuste, diámetros de copa, uso y nombres locales. Así mismo para complementar el inventario de los demás estratos, se colectaron especímenes de diferentes hábitos de crecimiento en estado reproductivo (flor o fruto), con el propósito de contribuir al conocimiento de la composición florística de cada sitio.

Finalmente se colectaron ejemplares botánicos de cada morfoespecie siguiendo la metodología estándar de procesamiento de plantas para un herbario. La determinación taxonómica de los ejemplares botánicos se realizó en el Herbario Amazónico Colombiano (COAH) del Instituto SINCHI, con base en la colección de referencia, empleando claves descriptivas y monografías taxonómicas.

Muestreo de suelos

Las muestras se colectaron siguiendo la metodología descrita por Corredor (2000), para lo cual se seleccionó un área de aproximadamente una hectárea, en la cual se trazó una diagonal imaginaria sobre la cual se señalaron seis puntos de colecta espaciados entre sí por aproximadamente 24 m. Sobre cada uno de los seis puntos se colectaron cinco sub-muestras ubicadas a 5 m del punto de referencia para obtener una muestra compuesta. Cada una de las sub-muestras se tomó retirando la capa de hojarasca superficial (si estaba presente) y tomando con una pala aproximadamente 100 g de suelo a una profundidad de 0 a 20 cm, posteriormente las sub-muestras fueron mezcladas, almacenadas en una bolsa plástica, rotuladas y mantenidas en frío hasta su procesamiento. En total se obtuvieron seis réplicas para cada sitio de muestreo.

Método independiente de cultivo

Extracción de ADN, amplificación del gen 16S ARNr y clonación

Se realizó la extracción de ADN de cada una de las muestras compuestas colectadas (seis muestras por bosque) usando el *kit FastDNA spin for soil* (MoBio-Laboratories) siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación del gen 16S ARNr se realizó utilizando los iniciadores universales para el dominio *Bacteria* 27F (5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1492R (5' -ACGGCTACCTTGTACGACTT) (Lane 1991). La mezcla de PCR contenía en un volumen de 50 μ l, 1,25U GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega M8295), 1X Buffer de PCR, 3,0 mM MgCl₂, 0,2 μ M de cada iniciador, 0,2 mM dNTPs, 0,1 mg/ml de BSA y aproximadamente 20 mg de ADN de cada una de las extracciones realizadas. Se utilizó un control negativo que carecía de ADN como molde. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador S1000 *Thermocycler* (BioRad) con un programa que incluía una denaturación inicial a 94°C por 2 minutos y 30 ciclos de denaturación a 94°C por 45 segundos, anillado a 55°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 3 minutos y una extensión final a 72°C durante 15 minutos. Los productos de PCR (pPCR) obtenidos para cada sitio de muestreo (seis por muestra) fueron

mezclados y purificados utilizando el *kit DNA clean & concentrator* (Zymo Research) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Los pPCR purificados fueron clonados usando el *kit TOPO TA cloning* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. En total se realizaron dos bibliotecas de clones por muestra de bosque y de cada reacción de clonación se seleccionaron 150 clones, obteniendo 300 clones por muestra. Para cada sitio muestreado se seleccionaron aleatoriamente 146 clones para su posterior secuenciación utilizando los iniciadores M13F y M13R. La secuenciación se realizó empleando el método de Sanger, en un Analizador Genético Applied Biosystems 3500, mediante el servicio SSiGMol del IGUN (Instituto de genética) de la Universidad Nacional sede Bogotá.

Análisis computacional de las secuencias de 16S ARNr

Todos los datos obtenidos a partir de los archivos de secuenciación automática del ADN fueron editados manualmente revisando los archivos tanto de la secuencia como del electroferograma para determinar nucleótidos codificados erróneamente, usando el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* versión 7.0 (Hall 1999) (<http://www.mbio.ncsu.edu/RNaseO/info/programs/BIOEDIT/bioedit.html>). Se generaron las secuencias consenso al concatenar las secuencias obtenidas con diferentes iniciadores originadas a partir del mismo molde de ADN, usando la aplicación *Contig Assembly Program* (CAP) del programa *BioEdit* versión 7.0 (Hall 1999). Posteriormente se determinó la presencia del vector usando el programa *Vecscreen* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) y las secuencias quiméricas usando el servidor *Bellerophon* (Huber *et al.* 2004) implementado en la página de *Greengenes* (DeSantis *et al.* 2006) (http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-bel3_interface.cgi).

Todas las secuencias de 16S ARNr obtenidas en este estudio fueron comparadas contra la base de datos del GenBank (Benson *et al.* 1999), usando una base de datos no redundante (nr) y el algoritmo BLAST (por sus siglas en inglés *Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.* 1990) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) y contra la base de datos del RDP

versión 10 (Cole et al. 2003) usando la opción “*sequence match*” (http://redp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp).

Las secuencias obtenidas y las más cercanamente relacionadas con la base de datos del RDP fueron alineadas usando el aplicativo para alineamiento de secuencias del RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/myrdp/uploadSeqgrp.spr>) (Maidak et al. 2001). Las secuencias alineadas fueron ajustadas manualmente usando el programa Bioedit *Sequence Alignment Editor* versión 7.0 (Hall 1999) removiendo los nucleótidos ambiguos.

Análisis filogenético de las secuencias del 16S ARNr

El análisis filogenético de las secuencias alineadas se realizó usando el programa MEGA versión 4 (Tamura et al. 2007), las distancias evolutivas se calcularon usando el modelo evolutivo de Kimura-2 (Kimura 1980) y se construyó el dendrograma usando el método de *Neighbor-Joining* (Saito y Nei 1987). La topología del árbol fue examinada por el método de *Bootstrap* (Felsenstein 1985) realizando 1000 re-muestreos.

Las secuencias del 16S ARNr fueron agrupadas en unidades taxonómicas operacionales (OTUs) a una similitud del 97%, utilizando el algoritmo del vecino más lejano (opción por defecto) del programa DOTUR (*Distance-Based OTU and Richness Determination*) (<http://www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/dotur.html>; Schlossy Handelsman 2005). La cobertura se estimó usando la fórmula $C = n1/N$, donde $n1$ es el número de OTUs con un único clon y N es el número total de clones analizados (Good 1953).

Comparación filogenética de secuencias obtenidas en B1 y B2

Se realizó la comparación entre las comunidades bacterianas de los suelos de los dos bosques utilizando el programa Unifrac (<http://bmf2.colorado.edu/unifrac/>) (Lozupone y Knight 2005), que mide la distancia filogenética entre los taxones de diferentes muestras graficadas en un árbol filogenético e identificando aquellas longitudes de ramas únicas dentro del árbol,

que son atribuibles a una muestra particular y que reflejan presumiblemente adaptación a un ambiente. La distancia filogenética entre cada comunidad fue considerada significativa a un valor $p=0,05$, se realizó corrección de Bonferroni.

Método dependiente de cultivo

Cultivos microbianos

Se tomó aproximadamente 1 g de suelo y se adicionó a 100 ml de solución salina (0,9% p/v de NaCl) estéril, la solución se dejó en agitación durante 30 minutos. Posteriormente, 1 ml de la solución se transfirió a tubos de ensayo que contenían 9 ml de solución salina estéril y se realizaron diluciones seriadas hasta obtener una dilución de 10^{10} . A partir de la dilución 10^3 se tomó 1 ml como inóculo para realizar los enriquecimientos en los medios que se describen a continuación.

Se utilizaron tres medios de cultivos denominados AS (Agar suelo), CEL (medio celulosa) y XIL (medio xilano). El medio AS fue preparado re-suspendiendo 100 g de suelo en un litro de agua destilada y dejando en agitación constante durante una hora. Posteriormente el medio fue filtrado y llevado a esterilización por autoclave durante 40 minutos a 121°C y 15 psi. Para solidificar el medio se agregó agar-agar a una concentración final de 1,5% (p/v). Los medios denominados CEL y XIL se realizaron partiendo de un medio básico de sales (MB) que contenía por litro de solución 2,2 g de K_2HPO_4 , 1,5 g de KH_2PO_4 , 1,3 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 1,25 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, este MB fue suplementado con 0,5 g de extracto de levadura (Oxoid LP0021), 1 ml de solución SL10 (Widdel et al. 1983) y 5 g de celulosa (Sigma C6288) para el medio denominado CEL o 5 g de xilano (Sigma X0502) para el medio denominado XIL, el pH se ajustó a 5,0.

Una vez se observó crecimiento en las diferentes series de cultivo, se realizaron siembras en superficie tomando 0,1 ml de cada inóculo y realizando siembras masivas en los mismos medios de cultivo pero en estado sólido. Las placas fueron incubadas a 27°C hasta observar crecimiento (aproximadamente 48 horas).

Para el aislamiento de los microorganismos se realizaron siembras sucesivas en medio sólido hasta observar el desarrollo de un único tipo de colonia. De cada cultivo se tomó una colonia y se inoculó en el medio líquido de aislamiento para su posterior almacenamiento en glicerol a una concentración final de 15% (v/v) a -70°C .

Identificación taxonómica de los microorganismos aislados

Los microorganismos fueron repicados en caldo infusión cerebro corazón (BHI-Oxoid) e incubados a 30°C durante 24 horas. La biomasa se recuperó centrifugando a 5,000 rpm durante 10 min. La biomasa recuperada se lavó con solución salina (0,9% p/v de NaCl), posteriormente se realizó la extracción de ADN con el kit *ZR Fungal/Bacteria DNA Miniprep* (ZymoResearch D6005) y la amplificación del gen 16S ARNr siguiendo el protocolo descrito por Lane (1991). La amplificación se realizó usando los iniciadores universales 27F y 1492R descritos anteriormente. El pPCR fue purificado como se describió anteriormente, la concentración final del pPCR purificado fue evaluado por fluorimetría y por la realización de geles de agarosa al 1% (p/v). Una vez se verificó la concentración del pPCR se preparó cada una de las muestras siguiendo las instrucciones del servicio de secuenciación SSiGMol. Las

secuencias fueron comparadas con las depositadas en la base de datos del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) como se describió para el análisis de las secuencias obtenidas por clonación del gen 16S ARNr.

RESULTADOS

Descripción de la vegetación dominante

El bosque B1 presentó una altura promedio de 25 m, con diámetros a la altura de pecho (DAP) de hasta 80 cm, bajo epifitismo, sotobosque abierto y suelo con poca hojarasca. Con base en el inventario de parcelas se detectó que en el bosque B1 predominaron las familias *Arecaceae*, *Sterculiaceae*, *Lauraceae*, *Rubiaceae*, *Annonaceae* y *Cyatheaceae*, siendo las dos primeras familias las que presentaron el mayor número de especies diferentes (Tabla 1).

El bosque B2 se caracterizó por presentar un paisaje de cordillera baja, con pendiente de 45° , una altura media de 15 m, con DAP de hasta 40 cm, alta presencia de lianas, alto epifitismo, sotobosque denso y suelo con hojarasca de 15-20 cm. En cuanto a la vegetación dominante se detectó predominio de las familias *Myristicaceae*, *Vochysiaceae*, *Burseraceae* y *Lecythydiaceae*. Siendo las dos primeras familias las que presentaron el mayor número de especies diferentes (Tabla 1).

TABLA I. COMPOSICIÓN FLORÍSTICA DE LOS BOSQUES B1 Y B2 UBICADOS EN EL DEPARTAMENTO DE CAQUETÁ.

COMPOSICIÓN FLORÍSTICA DE LOS BOSQUES EVALUADOS			
BOSQUE 1		BOSQUE 2	
Familia	Especie	Familia	Especie
Arecaceae	<i>Oenocarpus bataua</i>	Myristicaceae	<i>Osteophloeum platyspermum</i>
	<i>Iriartea deltoidea</i>		<i>Otoba parvifolia</i>
	<i>Geonoma deversa</i>		<i>Virola elongata</i>
	<i>Socratea exorrhiza</i>		
Sterculiaceae	<i>Theobromas subincanum</i>	Vochysiaceae	<i>Qualea ingens</i>
	<i>Sterculia frondosa</i>		<i>Vochysia grandis</i>
Lauraceae	<i>Ocotea quixos</i>	Burseraceae	<i>Protium apiculatum</i>
Rubiaceae	<i>Capinora decorticans</i>		
Annonaceae	<i>Guatteria sp</i>	Lecythydiaceae	<i>Eschweilera bracteosa</i>
Cyatheaceae	<i>Cyathea sp</i>		

Método independiente de cultivo

Para identificar la composición de la comunidad bacteriana de las muestras analizadas, se realizó la edición manual de cada una de las secuencias y la verificación de la presencia de secuencias quiméricas, de la muestra B1 se analizaron 96 secuencias, de las cuales no fue posible clasificar dos en los grupos microbianos reportados a la fecha. Las demás secuencias fueron clasificadas en seis Fila relacionados con *Acidobacteria* de las sub-divisiones Gp1, Gp2, Gp3, Gp5 y Gp13 (39% de las secuencias), *Proteobacteria* de las clases a, b, g y d-*Proteobacteria* (39%), *Actinobacteria* de los ordenes *Acidiomicrobiales*, *Solirubrobacterales* y *Actinomycetales* (5%), *Planctomycetes* del orden *Planctomycetales* (5%),

Chloroflexi del orden *Ktenodonobacterales* (4%) y *Firmicutes* del orden *Clostridiales* (2%) (Figura 1).

De la muestra B2 se trabajó con 105 secuencias de las cuales no fue posible clasificar una en los grupos microbianos reportados a la fecha, las secuencias restantes fueron clasificadas en siete Fila relacionadas con *Acidobacteria* de las sub-divisiones Gp1, Gp2, Gp3, Gp6, Gp13 (53% de las secuencias), *Proteobacteria* de las clases a, g, b y d-*Proteobacteria* (38,5%), *Actinobacteria* del orden *Acidiomicrobiales* (3%), *Firmicutes* del orden *Clostridiales* (2%), *Bacteroidetes* del orden *Sphingobacteriales* (1%), *Verrucomicrobia* del orden *Verrucomicrobiales* (1%) y *Chloroflexi* del orden *Ktedonobacterales* (1%) (Figura 1).

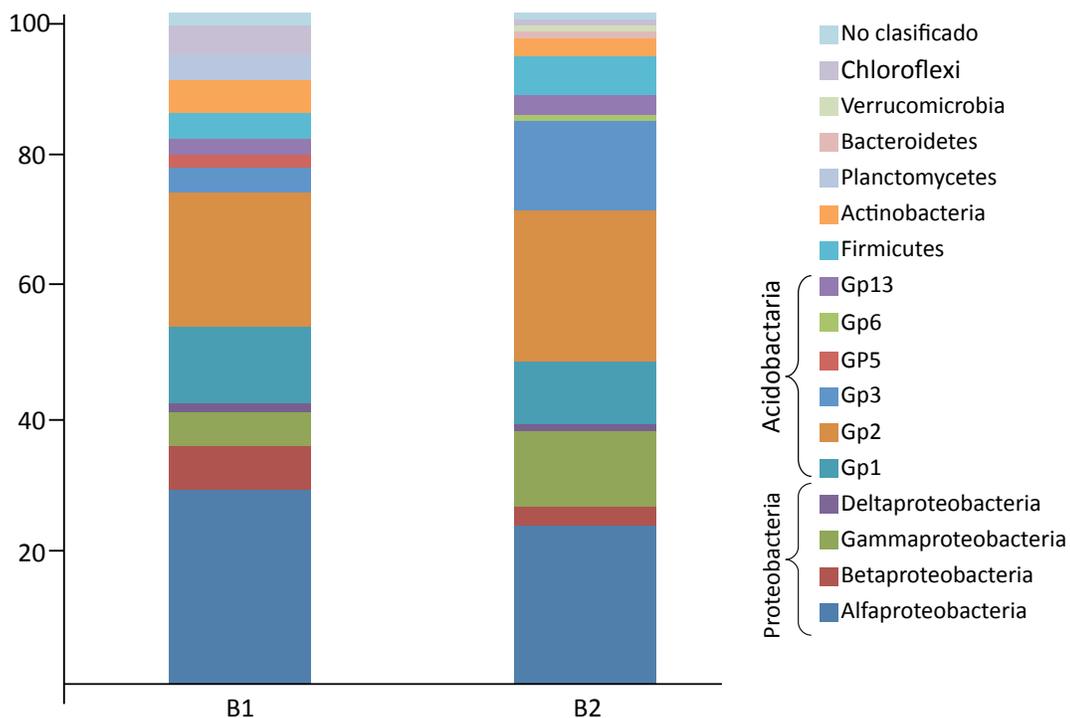


FIGURA 1. PORCENTAJE DE INCIDENCIA DE LOS DIFERENTES GRUPOS MICROBIANOS DETECTADOS EN LOS DOS BOSQUES B1 Y B2.

Las secuencias analizadas a partir de las bibliotecas de clones realizadas para los bosques B1 y B2, fueron comparadas mediante un análisis del grado total de divergencia filogenética utilizando el algoritmo UniFrac, que reveló que no hay diferencias altamente significativas ($p = 0,18$) a un nivel de confianza del 95%) entre los dos grupos de taxones obtenidos.

Por otra parte, una vez se analizaron las secuencias se procedió a su agrupación en OTUs (basada en un porcentaje de similitud del 97%) para la posterior estimación de la cobertura, la cual indicó que con el esfuerzo de muestreo realizado se detectó el 36 % y el 45% de la comunidad bacteriana de los bosques B1 y B2 respectivamente.

En la biblioteca de clones del bosque B1 se identificaron 79 OTUs, el 80% de estas OTUs corresponden a “singletons” ya que presentan solo un clon asociado. En el Filum *Acidobacteria* se detectaron 26 OTUs de las cuales seis fueron asignados a la sub-división Gp1, 13 a la sub-división Gp2, cuatro a la sub-división Gp3, dos a la sub-división Gp5 y una a la sub-división Gp13, la mayoría de las OTUs están relacionadas (<95% de similitud) con organismos no cultivado reportados en diferentes muestras ambientales (Figura 2).

En el Filum *Proteobacteria* se encontraron 32 OTUs, de éstos se determinó que 22 hacen parte de la clase *α-Proteobacteria* y están relacionadas con organismos no cultivados de los órdenes *Rhizobiales* y *Rhodospirillales*, también se identificaron cinco OTUs de la clase *β-Proteobacteria* relacionadas con organismos del género *Burkholderia* (>97% de similitud), tres OTUs de la clase *γ-Proteobacteria* relacionadas con organismos de los géneros *Pseudomonas* (99% de similitud) y *Dyella* (95% de similitud), y dos OTUs de la clase *δ-Proteobacteria* relacionadas con organismos no cultivados del orden *Myxococcales* (95% de similitud) (Figura 3).

En el Filum *Firmicutes* se encontraron tres OTUs de la clase *Clostridia*, uno cercanamente relacionada a *Clostridium magnum* (98% de similitud) y los otros dos relacionadas con organismos no cultivados detectados en procesos de desnitrificación y fijación de nitrógeno (Rosch y Bothe 2005) y en procesos de degradación de lignocelulosa (Guoet al. 2010). En el Filum *Actinobacteria* se detectaron cinco OTUs relacionadas con organismos no cultivados de los órdenes *Rubrobacterales* (98% de similitud) y *Actinomycetales* (90% de similitud) y con *Mycobacterium celatum* (95% de similitud). Del Filum *Planctomycetes* se detectaron cuatro OTUs relacionadas con organismos no cultivados detectados en muestras de suelos de bosques tropicales (98% de similitud) (Kanokratana et al. 2007) y pantanos ácidos (99% de similitud) (Ivanova y Dedysh 2012) entre otros. En el Filum *Chloroflexi* se identificaron cuatro OTUs relacionadas con organismos no cultivados reportados en suelos de bosque de montaña (>96% de similitud) (Lin et al. 2011) y en suelos de bosque de la

Amazonía de Brasil (> 96% de similitud) (da C Jesús et al. 2009) (Figura 4).

En la biblioteca de clones del bosque B2 se detectaron 77 OTUs de las cuales el 77% corresponden a “singletons”. En el Filum *Acidobacteria* se detectaron 38 OTUs de las cuales siete OTUs fueron asignadas a la sub-división Gp1, 15 a la sub-división Gp2, 13 a la sub-división Gp3, una a la sub-división Gp6 y dos a la sub-división Gp13, al igual que para las OTUs obtenidas en el bosque B1, en este caso la mayoría de OTUs están distantemente relacionadas con organismos cultivados (Figura 2).

En el Filum *Proteobacteria* se encontraron 25 OTUs, de las cuales 16 corresponden a *α-Proteobacteria*, estas OTUs en su mayoría están asociados con organismos no cultivados de los órdenes *Rhizobiales* y *Rhodospirillales*, también se identificaron dos OTUs de la clase *β-Proteobacteria* cercanamente relacionados con organismos del género *Burkholderia* (97% de similitud), seis OTUs de la clase *γ-Proteobacteria* relacionadas con *Dyella Japonica* (98% de similitud) y con organismos no cultivados reportados en el estudio de la diversidad microbiana de suelo en bosques tropicales (Kanokratana et al. 2011) y subtropicales (Lin et al. 2012) y una OTU *δ-Proteobacteria* relacionada con un organismo no cultivado reportado en hábitats terrestres del Antártico (Yergeau et al. 2007) (Figura 3).

En el Filum *Firmicutes* se identificaron cinco OTUs relacionados en su mayoría con organismos no cultivados de la clase *Clostridia* detectados en suelos de un bosque prístino y Petra de la Amazonía Brasileira (Kim et al. 2007). Al Filum *Bacteroidetes* se asignó un OTU distantemente relacionado con *Chitinophaga terrae* (93% de similitud) (Kim y Jung 2007). Al Filum *Actinobacteria* se asignaron tres OTUs relacionadas con organismos no cultivados (>97% de similitud) reportados en diferentes hábitats terrestres (Yergeau et al. 2007; Lesaulnier et al. 2008). A los Filum *Verrucomicrobia* y *Chloroflexi* se asignó un OTU relacionado con organismos no cultivados detectados mediante el estudio de diversidad microbiana en diferentes muestras ambientales (93% de similitud) (Figura 4).

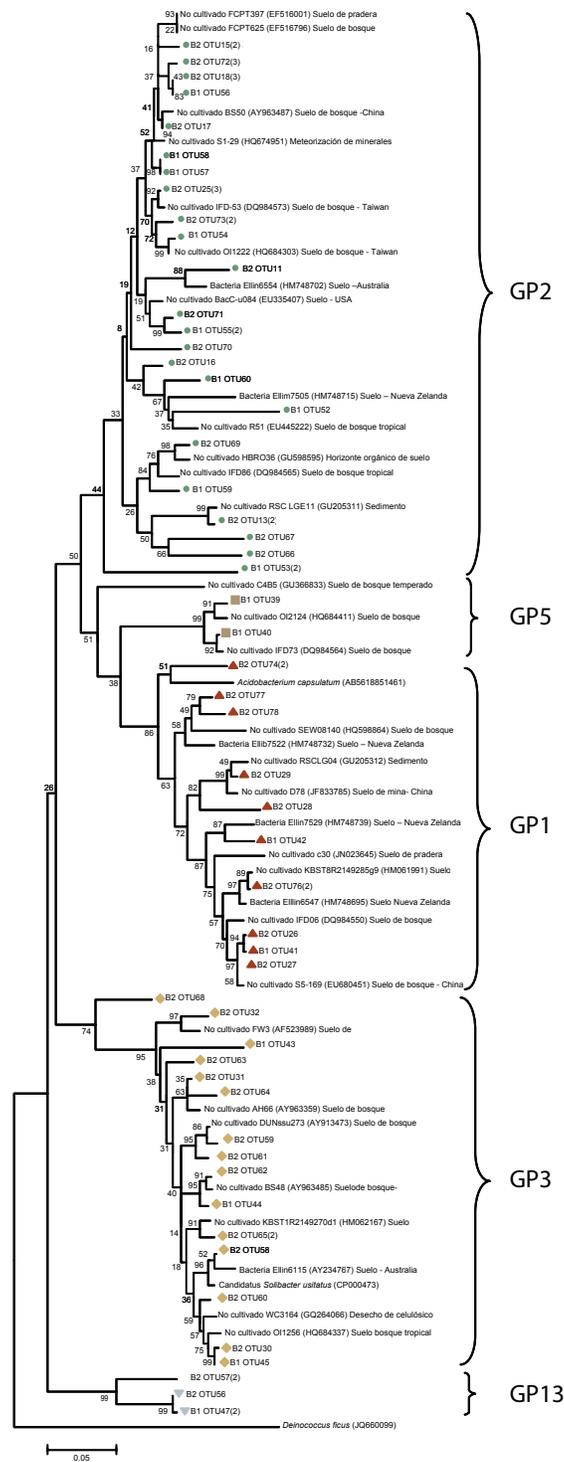


FIGURA 2. DENDROGRAMA DE LAS SECUENCIAS DE CLONES RECUPERADAS EN LAS MUESTRAS B1 Y B2 RELACIONADAS AL FILUM *ACIDOBACTERIA*. LA HISTORIA EVOLUTIVA FUE INFERIDA USANDO EL MÉTODO DE NEIGHBOR-JOINING. SE REALIZÓ UN *BOOTSTRAP* DE 1000 REPETICIONES CUYOS PORCENTAJES SE PRESENTAN EN CADA RAMA DEL ÁRBOL. LA DISTANCIA EVOLUTIVA FUE CALCULADA USANDO EL MÉTODO DE KIMURA-2. TODAS LAS POSICIONES QUE CONTENÍAN *GAPS* FUERON ELIMINADAS PARA EL ANÁLISIS (OPCIÓN DE ELIMINACIÓN COMPLETA). EL DENDROGRAMA MUESTRA UN CLON REPRESENTATIVO DE CADA OTU, LA CUAL AGRUPA TODOS LOS CLONES QUE PRESENTARON 97% DE SIMILITUD, ENTRE PARÉNTESIS EL NÚMERO DE CLONES ASOCIADOS A ESE OTU Y LA SECUENCIA MÁS CERCANAMENTE RELACIONADA OBTENIDA DE LA BASE DE DATOS DEL GENBANK. SE UTILIZÓ COMO GRUPO EXTERNO LA SECUENCIA DE *DEINOCOCCUS FICUS* (JQ660099). CADA GRUPO SE IDENTIFICA CON UN COLOR.

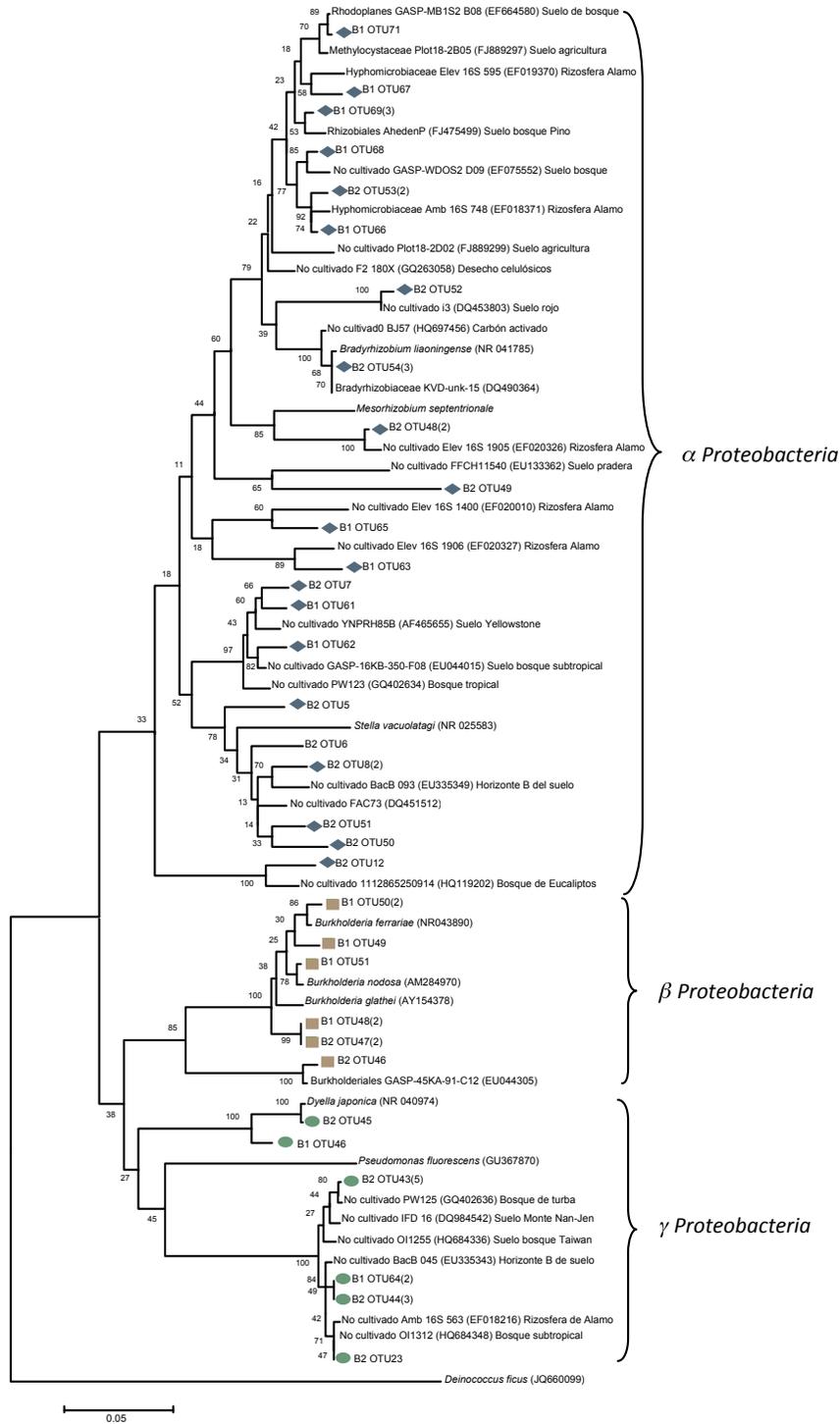


FIGURA 3. DENDROGRAMA DE LAS SECUENCIAS DE CLONES RECUPERADAS EN LAS MUESTRAS B1 Y B2 RELACIONADAS AL FILUM *PROTEOBACTERIA*. LA HISTORIA EVOLUTIVA FUE INFERIDA USANDO EL MÉTODO DE NEIGHBOR-JOINING. SE REALIZÓ UN *BOOTSTRAP* DE 1000 REPETICIONES CUYOS PORCENTAJES SE PRESENTAN EN CADA RAMA DEL ÁRBOL. LA DISTANCIA EVOLUTIVA FUE CALCULADA USANDO EL MÉTODO DE KIMURA-2. TODAS LAS POSICIONES QUE CONTENÍAN *GAPS* FUERON ELIMINADAS PARA EL ANÁLISIS (OPCIÓN DE ELIMINACIÓN COMPLETA). EL DENDROGRAMA MUESTRA UN CLON REPRESENTATIVO DE CADA OTU, EL CUAL AGRUPA TODOS LOS CLONES QUE PRESENTARON 97% DE SIMILITUD. ENTRE PARÉNTESIS EL NÚMERO DE CLONES ASOCIADOS A ESE OTU Y LA SECUENCIA MÁS CERCANAMENTE RELACIONADA OBTENIDA DE LA BASE DE DATOS DEL GENBANK. SE UTILIZÓ COMO GRUPO EXTERNO LA SECUENCIA DE *DEINOCOCCUS FICUS* (JQ660099). CADA GRUPO SE IDENTIFICA CON UN COLOR.

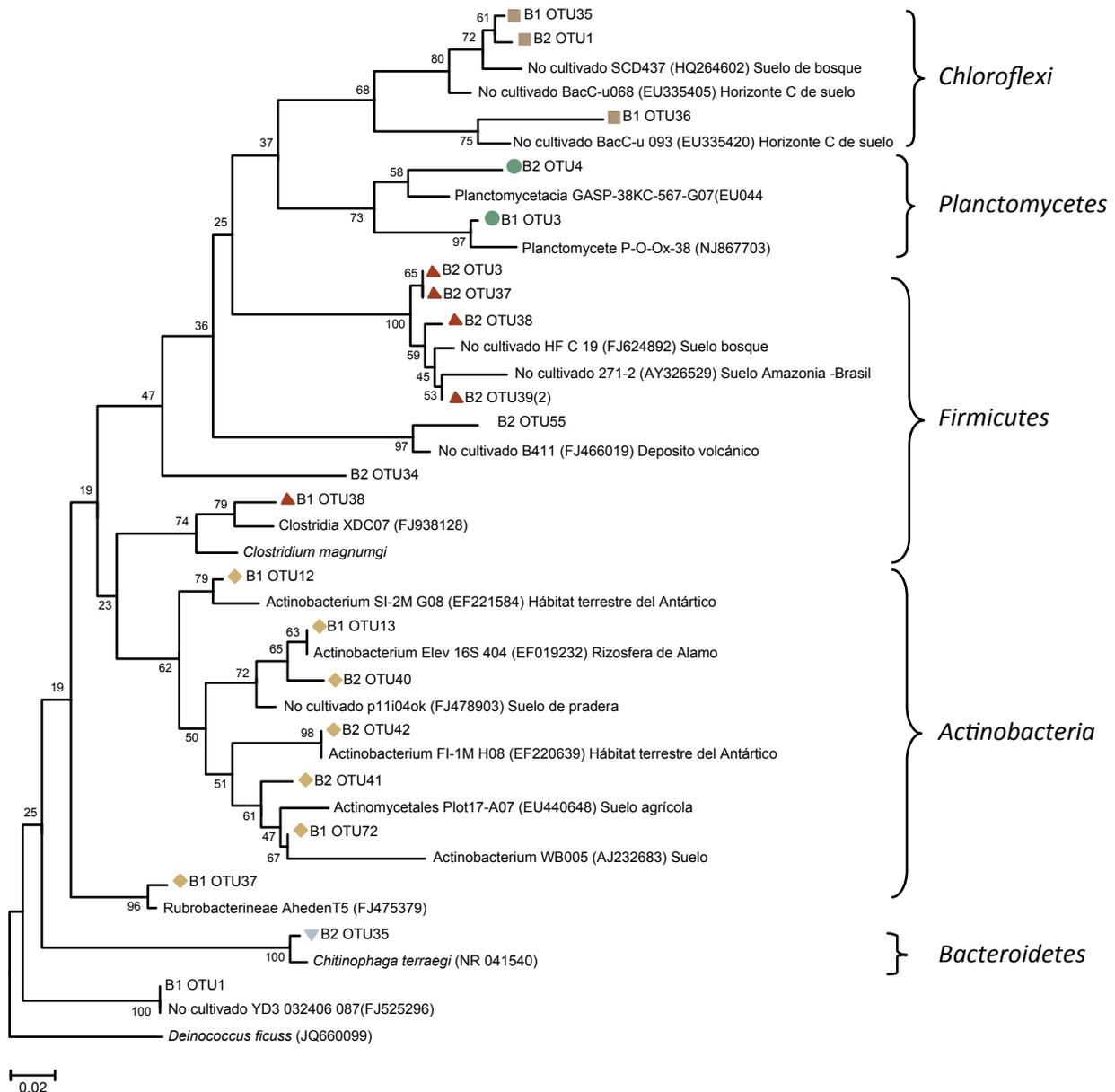


FIGURA 4. DENDROGRAMA DE LAS SECUENCIAS DE CLONES RECUPERADAS EN LAS MUESTRAS B1 Y B2 RELACIONADAS CON *CHLOROFLEXI*, *PLANCTOMYCETES*, *FIRMICUTES*, *ACTINOBACTERIA* Y *BACTEROIDETES*. LA HISTORIA EVOLUTIVA FUE INFERIDA USANDO EL MÉTODO DE NEIGHBOR-JOINING. SE REALIZÓ UN *BOOTSTRAP* DE 1000 REPETICIONES CUYOS PORCENTAJES SE PRESENTAN EN CADA RAMA DEL ÁRBOL. LA DISTANCIA EVOLUTIVA FUE CALCULADA USANDO EL MÉTODO DE KIMURA-2. TODAS LAS POSICIONES QUE CONTENÍAN *GAPS* FUERON ELIMINADAS PARA EL ANÁLISIS (OPCIÓN DE ELIMINACIÓN COMPLETA). EL DENDROGRAMA MUESTRA UN CLON REPRESENTATIVO DE CADA OTU, EL CUAL AGRUPA TODOS LOS CLONES QUE PRESENTARON 97% DE SIMILITUD, ENTRE PARÉNTESIS EL NÚMERO DE CLONES ASOCIADOS A ESA OTU Y LA SECUENCIA MÁS CERCANAMENTE RELACIONADA OBTENIDA DE LA BASE DE DATOS DEL GENBANK. SE UTILIZÓ COMO GRUPO EXTERNO LA SECUENCIA DE *DEINOCOCCUS FICUS* (JQ660099). CADA GRUPO SE IDENTIFICA CON UN COLOR.

Método dependiente de cultivo

Los enriquecimientos permitieron el aislamiento de bacilos aerobios en su mayoría Gram-negativos del dominio *Bacteria* relacionados con el filo *Proteobacteria* de las clases *a*, *b* y *g-Proteobacteria*, además se aisló un organis-

mo Gram-positivo del filo *Firmicutes*. De la muestra B1 se aislaron 11 cepas relacionadas con los géneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Pandoraea*, *Dyella*, *Pseudomonas* y *Yokenella* tal como se presenta en la Tabla 2.

TABLA 2. CEPAS AISLADAS DE LA MUESTRA DEL BOSQUE B1 UTILIZANDO DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVOS Y SU RELACIÓN TAXONÓMICA.

Cepa	Medio de aislamiento	Clase/familia	Organismos más cercanamente relacionado (número de cepa tipo ^T) (acceso GenBank)	Porcentaje de similitud
CEL1	CEL	Alfaproteobacteria/ <i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Mesorhizobium plurifarum</i> LMG 11892 ^T (Y14158)	99,6%
CEL2	CEL	Alfaproteobacteria/ <i>Rhizobiaceae</i>	<i>Rhizobium multihospitium</i> CCBAU 83401 ^T (EF035074)	100%
ASD	AS	Alfaproteobacteria/ <i>Rhizobiaceae</i>	<i>Rhizobium hainanense</i> I66 ^T (U71078)	99,6%
CEL10 ⁻⁶	CEL	Betaproteobacteria/ <i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia arboris</i> R-24201 ^T (AM747630)	99,7%
XILB1(4)	XIL	Betaproteobacteria/ <i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia diffusa</i> R-15930 ^T (AM747629)	98%
XILB1(2)	XIL	Betaproteobacteria/ <i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia metallica</i> R-16017 ^T (AM747632)	99,7%
XILB1(2A)	XIL	Betaproteobacteria/ <i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia arboris</i> R-24201 ^T (AM747630)	99%
CEL3	CEL	Betaproteobacteria/ <i>Burkholderiaceae</i>	<i>Pandoraea oxalativorans</i> TA25 ^T (AB469785)	99%
XIL(3)	XIL	Gammaproteobacteria/ <i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Dyella japonica</i> XD53 ^T (AB110498)	98,7%
XIL(2)	XIL	Gammaproteobacteria/ <i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas asmoorei</i> RW10T (AM293566)	99%
CELB1(2)	CEL	Gammaproteobacteria/ <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Yokenella regensburgei</i> GTC 1377T (AB273739)	99,7%

De la muestra del bosque B2 se aislaron 10 cepas relacionadas con los géneros *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Gibbsiella* y *Bacillus* tal como se presenta en la Tabla 3.

TABLA 3. CEPAS AISLADAS DE LA MUESTRA B2 UTILIZANDO DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVOS Y SU RELACIÓN TAXONÓMICA.

Cepa	Medio de aislamiento	Clase/familia	Organismos más cercanamente relacionado (número de cepa tipo ^T) (acceso GenBank)	Porcentaje de similitud
XILB2(1)	XIL	Betaproteobacteria/ Burkholderiaceae	<i>Burkholderia arboris</i> R-24201 ^T (AM747630)	99%
XILB2(4)	XIL	Betaproteobacteria/ Burkholderiaceae	<i>Burkholderia oxyphila</i> OX-01 ^T (AB488693)	99%
XILB2(3)	XIL	Betaproteobacteria/ Burkholderiaceae	<i>Burkholderia diffusa</i> R-15930 ^T (AM747629)	99%
XILB2(2)	XIL	Betaproteobacteria/ Burkholderiaceae	<i>Burkholderia arboris</i> R-24201 ^T (AM747630)	99%
XILB2(3A)	XIL	Betaproteobacteria/ Burkholderiaceae	<i>Burkholderia anthina</i> R-4183 ^T (AJ420880)	99%
XIL3	XIL	Gammaproteobacteria/ Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14 ^T (AF468452)	99%
ASF	AS	Gammaproteobacteria/ Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas rhodesiae</i> CIP 104664 ^T (AF064459)	99%
ASE	AS	Gammaproteobacteria/ Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas extremaustralis</i> CT14-3 ^T (AJ583501)	99%
CELB2	CEL	Gammaproteobacteria/ Enterobacteriaceae	<i>Gibbsiella quercinecans</i> FRB 97 ^T (GU562337)	100%
XILB2(4A)	XIL	Bacilli/ Bacillaceae	<i>Bacillus luciferensis</i> LMG 18422 ^T (AJ419629)	99%

DISCUSIÓN

La caracterización florística indicó que los dos bosques presentan cobertura vegetal de bosques maduros y que no presentan similitud entre las familias vegetales dominantes, las cuales, a su vez son típicamente reportadas en selvas tropicales húmedas. En el bosque B1 predominaron palmas de la familia *Arecaceae*, seguido de la familia *Sterculiaceae* típica de tierras bajas (Doyle *et al.* 2004). En el bosque B2 por el contrario predominaron angiospermas de la familia *Myristicaceae*, seguido de especies de la familia *Vochysiaceae*, una familia de plantas fanerógamas perennes (Tabla 1). Estas diferencias podrían tener un efecto en el establecimiento y actividad microbiana debido a las propiedades químicas del material vegetal que queda a disposición de los microorganismos (Medina y Cuevas 2000). Además, entre los dos bosques se encontraron

diferencias relacionadas con la altura promedio del bosque, DAP, presencia de lianas, epifitismo y hojarasca, siendo esta última mayor en el bosque B2 y por tanto esto podría representar una mayor disponibilidad de carbono para la comunidad microbiana.

Medina y Cuevas (2000), reportan que la producción de residuos de la parte aérea de un bosque (hojas, ramas, flores), constituye una medida altamente correlacionada con la productividad primaria del mismo, siendo la hojarasca el componente más sensible a las condiciones nutricionales del suelo. Adicionalmente, el 95% de la masa de raíces finas se encuentra en los primeros 20 cm del suelo, de los cuales el 48% lo compone la estera radical en la cual ocurre la circulación rápida de nutrientes proveniente de la descomposición de la hojarasca, favoreciendo por ende el establecimiento de las comunidades microbianas.

En términos generales las comunidades bacterianas dominantes de las muestras de suelo de los bosques B1 y B2 están relacionadas con organismos de los Fila *Acidobacteria* y *Proteobacteria*, estos resultados siguen un patrón ampliamente reportado en diferentes estudios de microorganismos de suelo en los cuales se han detectado como los grupos más dominantes (Janssen 2006; Chan *et al.* 2006; Faoro *et al.* 2010; Will *et al.* 2010). En suelos de selva húmeda tropical como el Bosque Atlántico de Brasil que se caracteriza por presentar suelos con características similares a los de la Amazonia colombiana con valores de $\text{pH} \leq 4,5$, altos nivel de saturación de aluminio y baja saturación de bases, se ha reportado predominio de *Acidobacteria* (63%), seguido por *Proteobacteria* (25,2%) de las clases *a-*, *b*, *d* y *g-Proteobacteria*, además se han detectado los Fila *Actinobacteria* (1,2%), *Bacteroidetes* (1%), *Chloroflexi* (0,66%), *Firmicutes* (0,26%), *Planctomycetes* (0,4%), *Nitrospira* (0,4%), *Gemmatimonadetes* (1,6%) y OP10 (0,13%) (Faoro *et al.* 2010). A diferencia de los tres últimos grupos mencionados anteriormente, en los dos sitios de muestreo evaluados en este estudio se encontraron secuencias relacionadas con estos mismos Fila.

Aunque no se encontraron diferencias significativas ($p = 0,18$) al comparar la composición microbiana presente en los suelos de los dos bosques, si se observa una variación en el porcentaje de incidencia de cada grupo microbiano, lo cual podría estar relacionado con el bajo esfuerzo de muestreo, con diferencias en la composición florística de cada bosque, con la cantidad de hojarasca presente en el suelo e inclusive con estados de sucesión vegetal lo cual influye sobre la formación y estructura del suelo, y por ende en la distribución de las comunidades microbianas (Kennedy *et al.* 2005).

En particular se observan diferencias relacionadas con la presencia del Filum *Planctomycetes* el cual solo estuvo presente en la muestra analizada del bosque B1 y con los Fila *Verrucomicrobia* y *Bacteroidetes* que solo se encontraron en la muestra analizada del bosque B2. El hecho de capturar estos grupos microbianos al azar podría sugerir que en los bosques de estudio se encuentran en alto número, sin embargo, no es fácil inferir su función ni importancia en este

ecosistema pues no se dispone de suficiente información. Se ha reportado que los dos últimos Fila mencionados son mesófilos facultativos o anaerobios obligados, sacarolíticos y oligotróficos, aunque se han encontrado géneros de vida libre, también se han descrito endosimbiontes asociados a nematodos, y son abundantes en suelos con altos contenidos de carbono (Zchori-Fein *et al.* 2004; Bergmann *et al.* 2011), lo cual coincide con el alto contenido de hojarasca en el bosque B2.

Además, los datos obtenidos evidenciaron que las comunidades bacterianas dominantes presentes en los dos bosques (B1 y B2) siguen un patrón ampliamente reportado en diferentes estudios de microorganismos de suelo en los cuales se han detectado como los grupos más dominantes organismos de los Fila *Acidobacteria* y *Proteobacteria* (Janssen 2006; Chan *et al.* 2006; Faoro *et al.* 2010; Will *et al.* 2010).

Con respecto al Filum *Acidobacteria*, en las dos bibliotecas de clones se detectó predominio de las sub-divisiones Gp1, Gp2 y Gp3. Según se ha reportado, las sub-divisiones Gp1 y Gp2 son usualmente los más dominantes en suelos ácidos (Lauber *et al.* 2009), además de estar relacionados junto con las sub-divisiones Gp3 y Gp4 con condiciones en las cuales predominan bajas concentraciones de nutrientes (Chan *et al.* 2006). Sin embargo, su importancia ecológica aún no es clara ya que hay relativamente pocas especies aisladas y descritas (Lee *et al.* 2008). De las 26 subdivisiones existentes en este Filum se ha logrado aislar microorganismos solo de cinco sub-divisiones, algunos de ellos relacionados a la sub-división uno, tales como *Acidobacterium* (Kishimoto *et al.* 1991), *Terriglobus* (Eichorst *et al.* 2007), *Edaphobacter* (Koch *et al.* 2008) y *Telmatobacter* (Pankratov *et al.* 2012), a excepción de *Telmatobacter* que es un organismo anaerobio facultativo, estos organismos se caracterizan por ser aerobios, por crecer quimi-organotróficamente en presencia de azúcares simples y sustratos complejos como la celulosa, hemicelulosa, almidón y quitina.

Con respecto al Filum *Proteobacteria* se encontró que en el bosque B1 predominó *a-Proteobacteria/Rhizobiales* (26%), mientras que en B2 predomina-

ron tanto las clases *a-Proteobacteria/Rhizobiales* (21%) como *g-Proteobacteria/Pseudomonadales-Xanthomonadales* (12,5%). Los organismos relacionados al orden *Rhizobiales* están asociados principalmente a procesos de fijación de nitrógeno atmosférico (N₂) (Lin *et al.* 2007). Por su parte organismos de los ordenes *Pseudomonadales* y *Xanthomonadales* han sido ampliamente reportados en muestras de suelo y han sido detectados en muestras del sur del trapezio amazónico colombiano como solubilizadoras de fosfatos (Useche *et al.* 2004).

También se detectaron en las dos muestras de suelo grupos microbianos relacionados con *Clostridia* y *Actinomycetes* (<3%), estos dos grupos participan activamente en la degradación de materia orgánica. Estudios previos realizados en suelos de bosques Amazónicos en Brasil han evidenciado la presencia de *Clostridium* en bosques primarios y secundarios (Borneman y Triplett 1997; da C Jesús *et al.* 2009) y organismos del grupo *Actinomycetes* han sido previamente reportados en suelos de la Amazonia colombiana (Cardona *et al.* 2009).

Por otro lado la comunidad cultivable se vio reflejada en los resultados obtenidos por el método cultivo independiente, siendo los organismos asignados al Filum *Proteobacteria* y al género *Burkholderia* los de más amplia distribución en suelos de los dos bosques evaluados. *Burkholderia*, incluye un grupo diverso de bacterias ubicuas en la naturaleza, muchas de las cuales presentan propiedades benéficas como promotoras de crecimiento vegetal con capacidad para fijar nitrógeno atmosférico, como cepas de control biológico, como biorremediadoras (Coenye y Vandamme 2003; Salles *et al.* 2006, Otsuka *et al.* 2011) y como promotores de la meteorización de minerales facilitando la captura de hierro y fósforo por las plantas y otras bacterias (Hernández *et al.* 2004; Calvaruso *et al.* 2006). Para los bosques amazónicos es relevante la presencia de estos microorganismos, debido a que gran parte de esta vegetación está soportada por los procesos biológicos llevados a cabo por la microbiota edáfica, al ser suelos pobres en nutrientes y con saturaciones tóxicas de aluminio, la única forma de asimilación de los nutrientes por las plantas es dada por los mecanismos de mineralización mediados por este tipo de microorganismos.

También, en la muestra B1 se recuperaron cepas relacionadas con los géneros *Mesorhizobium* y *Rhizobium*, los cuales han sido comúnmente reportados en la rizósfera de bosques tropicales en donde participan en la fijación simbiótica de nitrógeno atmosférico, favoreciendo el crecimiento vegetal en suelos con deficiencia en nutrientes como el nitrógeno lo cual es comúnmente observado en suelos ácidos de la Amazonía colombiana (Mantilla-Paredes *et al.* 2009). Aun cuando en el reporte de la composición florística de los bosques muestreados no se evidencia la presencia de Familias de leguminosas, la presencia de estos géneros microbianos sugiere que están presentes. Además, se aislaron organismos de los géneros *Yokenella* y *Gibbsiella* los cuales han sido poco reportados en muestras de suelo, el género *Yokenella* fue propuesto por Kosako *et al.* (1984) y a la fecha solo hay un especie reportada y ha sido aislada con muy poca frecuencia en muestras de agua e intestino de insectos y el género *Gibbsiella* que a la fecha también cuenta con una única especie descrita, ha sido aislado de árboles de roble que presentaban sangrado (Brady *et al.* 2010).

En la muestra B2 se aisló el mayor número de organismos relacionadas al género *Pseudomonas*, las especies de este género están ampliamente distribuidas en el suelo e incluye varias especies de interés ambiental, tales como promotores de crecimiento vegetal (Patten y Glick 2002), patógenos de plantas (Palleroni 1993; Morris *et al.* 2007), biocontroladores por la producción de antibióticos y producción de sideróforos (Wu *et al.* 2009).

Aunque los enriquecimientos fueron realizados con extracto de suelo procedente de cada bosque y con sustratos como celulosa y xilano, dos polisacáridos derivados del componente estructural de las plantas y altamente abundante en estos suelos, se recuperó poca diversidad de grupos microbianos lo cual se podría explicar porque la utilización de medios de aislamiento y las condiciones de crecimiento utilizadas (incubación a 28-30°C bajo condiciones aeróbicas) pueden favorecer a las bacterias aeróbicas de rápido crecimiento, limitando a los organismos refractarios a las condiciones impuestas (McCaig *et al.* 2001), sin embargo, es necesario continuar con los esfuerzos

para optimizar medios de cultivos que faciliten la recuperación de microorganismos del suelo y por tanto se pueda profundizar en el estudio de sus características fisiológicas, bioquímicas y genéticas (Ben-Dov *et al.* 2009)

Todas las cepas aisladas en este trabajo se conservan en el banco de microorganismos edáficos del Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas - SINCHI, para su posterior caracterización.

En general, este estudio representa un punto de partida para identificar la composición de las comunidades bacterianas dominantes de suelos de bosques de selva húmeda tropical de la región Amazónica colombiana, específicamente en bosques con baja intervención antrópica del departamento de Caquetá, sin embargo, vale la pena considerar a futuro la evaluación de los factores abióticos que podrían estar moldeando estas comunidades y su dinámica a lo largo

de tiempo. Al mismo tiempo, el hecho de ingresar a la colección de microorganismos edáficos del Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas –Sinchi, cepas relacionadas con organismos de los cuales se han descrito importante funciones en la degradación de materia orgánica, en la fijación de nitrógeno atmosférico y en la solubilización de fósforo, facilitará su estudio fisiológico, genético y de aprovechamiento en procesos biotecnológicos.

AGRADECIMIENTOS

Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible por financiar los proyectos de inversión nacional y al personal de campo que acompañó los muestreos en el municipio de Belén de los Andaquíes - Caquetá.

A Herasmo Gonzáles de la Fundación Tierra Viva de Belén de los Andaquíes, por su continuo apoyo en el trabajo de campo.



Bosque maduro en piedemonte.

BIBLIOGRAFÍA

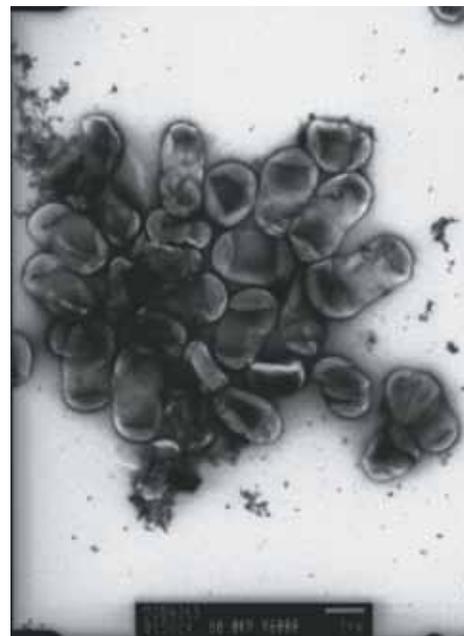
- Altschul SF, TL Madden, AA Schäffer, J Zhang, Z Zhang, W Miller, DJ Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Ben-Dov E, E Kramarsky-Winter, A Kushmaro. 2009. An in situ method for cultivating microorganisms using a double encapsulation technique. *FEMS Microbiology Ecology* 68:363-371.
- Benson DA, MS Boguski, DJ Lipman, J Ostell, BFF Ouellette, BA Rapp, DL Wheeler. 1999. GenBank. *Nucleic Acids Research* 27:12-17.
- Bergmann GT, ST Bates, KG Eilers, CL Lauber, JG Caporaso, WA Walters, R Knight, N Fierer. 2011. The under-recognizer dominance of *Verrucomicrobia* in soil bacterial communities. *Soil Biology & Biochemistry* 43:1450-1455.
- Borneman J, EW Triplett. 1997. Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology* 63:2647-2653.
- Brady C, S Denman, S Kirk, S Venter, P Rodríguez-Palenzuela, T Coutinho. 2010. Description of *Gibbsiellaquercinecans* gen. nov., sp. nov., associated with acute oak decline. *Systematic and Applied Microbiology* 33:444-450.
- Calvaruso C, MP Turpault, P Frey-Klett. 2006. Root-associated bacteria contribute to mineral-weathering and to mineral nutrition in trees, a budgeting analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 72:1258-1266.
- Cardona GL; AL Arcos; UG Ariel. 2005. Abundancia de actinomicetos y micorrizas arbusculares en paisajes fragmentados de la Amazonia colombiana. *Agronomía Colombiana* 23(2): 317-326.
- Cardona GI, Peña-Venegas CP, Ruiz-García M. 2009. Comunidades de actinomicetos en tres tipos de vegetación de la Amazonia colombiana: abundancia, morfotipos y el gen 16s ADNr. *Revista de Biología Tropical*. 57 (4): 1119-1139.
- Chan OC, X Yang, Y Fu, Z Feng, L Sha, P Casper, X Zou. 2006. 16S rRNA gene analysis of bacterial community structure in the soils of evergreen broad-leaved forest in south-west China. *FEMS Microbiology Ecology* 58:247-259.
- Corredor P. 2002. Estructura de la comunidad edáfica del género *Streptomyces* en bosques relictuales y agroecosistemas del Quindío (Andes Colombianos). Tesis de Biología. Bogotá, Colombia. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. 83 p.
- Da C Jesús E, T Marsh, JM Tiedje, FM de S Moreira. 2009. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. *The ISME Journal*, 3:1004-1011.
- DeSantis TZ, P Hugenholtz, N Larsen, M Rojas, EL Brodie, K Keller, T Huber, D Dalevi, P Hu, GL Andersen G.L. 2006. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology* 72:5069-5072.
- Doyle J.A., H Sauquet, T Scharaschkin, A Le Thomas. 2004. Phylogeny, molecular and fossil dating, and biogeographic history of Annonaceae and Myristicaceae (Magnoliales). *International Journal of Plant Sciences* 165: 855-867.
- Eichorst SA, JA Breznak, TM Schmidt. 2007. Isolation and characterization of soil bacteria that define *Terriglobus* gen. nov., in the phylum *Acidobacteria*. *Applied and Environmental Microbiology* 73:2708-2717.
- Faoro H, AC Alves, EM Souza, LU Rigo, LM Cruz, SM Al-Janaibi, RA Monteiro, V Baura, FO Pedrosa. 2010. Influence of soil characteristics on the diversity of Bacteria in the Southern Brazilian Atlantic Forest. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(4):4744-4749.
- Felsenstein J. 1958. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-79.
- Flórez, CJ. 2001. Pautas y prioridades en la investigación de la diversidad microbiana: importancia de la DM en términos de conocimiento, conservación y uso sostenible, recomendando pautas de acción sobre el tema para Colombia. BIOSINTE-SIS. Boletín Instituto de Investigación de recursos biológicos Alexander Von Humboldt N 28. ISSN-0123-7896. p. 1-4.
- Giovannoni SJ, RA Foster, MS Rappé, S Epstein. 2007. New cultivation strategies bring more microbial plankton species into the laboratory. *Oceanography* 20: 62-69.
- Gobernación de Caquetá. 2012. Caquetá: Gobierno de oportunidades. Plan de desarrollo 2012-2015. <http://caqueta.gov.co/descargas/PDD+CAQUETA+VERSION+FINAL+MAYO+27+2012+3+20+pm.pdf>
- Good IJ. 1953. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40:1107-1114.
- Guo P, W Zhu, H Wang, Y Lu, X Wang, D Zheng, Z Cui. 2010. Functional characteristics and diversity of a novel lignocelluloses degrading composite microbial system with high xylanase activity. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20(2):254-264
- Hall TA. 1999. Bioedit: a user-friendly biology sequence alignment editor and analysis program 248 for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 95-98.
- Hernández ME, A Kappler, DK Newman. 2004. Phenazines and other redox-active antibiotics promote microbial mineral reduction. *Applied and Environmental Microbiology* 70:921-928.
- Huber T, G Faulkner, P Hugenholtz. 2004. BELLEROPHON: a program to detect chimeric sequences in multiple alignments. *Bioinformatics* 20:2317-2319

- IGAC-Instituto Geográfico Agustín Codazzi. 1993. Aspectos ambientales para el ordenamiento territorial del occidente del departamento del Caquetá. Investigaciones para la Amazonia INPA I. Instituto Geográfico Agustín Codazzi IGAC y Fundación Tropenbos. Bogotá.
- Ivanova AO, SN Dedysh. 2012. Abundance, diversity, and depth distribution of planctomycetes in acidic northern wetlands. *Front Microbiol* 3: 5
- Janssen PH. 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 72:1719–1728.
- Kanokratana P, T Uengwetwanit, U Rattanachomsri, B Bunternngsook, T Nimchua, S Tangphatsornruang, V Plengvidhya, V Champreda, L Eurwilaichitr. 2007. Insights into the phylogeny and metabolic potential of a primary tropical peat swamp forest microbial community by metagenomic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (21):9029-9034
- Kennedy N, S Edwards, N Clipson. 2005. Soil bacterial and fungal community structure across a range of unimproved and semi-improved upland grasslands. *Microbial Ecology* 50(3): 463-473.
- Kim MK, HY Jung. 2007. *Chitinophaga terrae* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57:1721-1724.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Kishimoto N, Kosako Y, Tano T. 1991. *Acidobacterium capsulatum* gen. nov., sp. nov.: an acidophilic chemoorganotrophic bacterium containing menaquinone from acidic mineral environment. *Current Microbiology* 22:1-7.
- Kremen C, RK Colwell, TL Erwin, DD Murphy, RF Noss, MA Sanjayan. 1993. Terrestrial arthropod assemblages: their use in conservation planning. *Conservation Biology*; 7:796-808.
- Koch IH, F Gich, PF Dunfield, J Overmann. 2008. *Edaphobacter modestus* gen. nov., sp. nov., and *Edaphobacter aggregans* sp. nov., acidobacteria isolated from alpine and forest soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58:1114-1122.
- Kosako Y, R Sakazaki, E Yoshizaki. 1984. *Yokenellaregensburgi* gen. nov., sp. nov.: a new genus and species in the family Enterobacteriaceae. *Japanese Journal of Medical Science & Biology* 37:117-124
- Lane DJ 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In *Stackebrandt & Goodfellow. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, New York. p.115–175.
- Lauber C, M Hamady, R Knight, N Fierer. 2009. Pyrosequencing based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology* 75:5111–5120
- Lee SH, JO Ka, JC Cho. 2008. Members of the phylum *Acidobacteriia* are dominant and metabolically active in rhizosphere soil. *FEMS Microbiology Letters* 285(2):263-269.
- Lesaulnier C, D Papamichail, S McCorkle, B Ollivier, S Skiena, S Taghavi, D Zak, D van der Lelie. 2008. Elevated atmospheric CO₂ affects soil microbial diversity associated with trembling aspen. *Environmental Microbiology* 10(4):926-941
- Lin DX, CX Man, ET Wang, WX Chen. 2007. Diverse rhizobia that nodulate two species of *Kummerowia* in China. *Archives of Microbiology* 188:495-507.
- Lin YT, K Jangid, WB Whitman, DC Coleman, CY Chiu. 2011. Soil bacterial communities in native and regenerated perhumidmontane forests. *Applied Soil Ecology* 47(2):111-118
- Lozupone C, R Knight. 2005. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 71:8228–8235
- McCaig A, S Grayston, J Prosser, A Glover. 2001. Impact of cultivation on characterization of species composition of soil bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*. 35: 37-48.
- Mantilla AJ. 2008. Abundancia de bacterias diazotrofas en suelos del sur del Trapecio amazónico con potencial para el desarrollo de biofertilizantes. Tesis Maestría en Ciencias Biológicas. Bogotá, Colombia. Facultad de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. 150 p.
- Mantilla-Paredes AJ, GI Cardona, CP Peña-Venegas, U Murcia, M Rodríguez, MM Zambrano. 2009. Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos bajo tres coberturas vegetales en el sur del Trapecio Amazónico. *Revista de Biología Tropical* 57:915-927.
- Medina, E & E. Cuevas. 2000. Eficiencia de utilización de nutrientes por plantas leñosas: Eco-fisiología de bosques de San Carlos de Río negro. En: flora y vegetación de San Carlos de Río Negro y alrededores, Estado Amazonas, Venezuela. *Scientia Guaianae*. 11: 51-70
- Morris CE, LL Kinkel, K Xiao, P Prior, DC Sands. 2007. Surprising niche for the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Infection, Genetics and Evolution* 7:84–92
- Otsuka Y, Y Muramatsu, Y Nakagawa, Y Matsuda, M Nakagawa, H Murata. 2011. *Burkholderia oxyphila* sp. nov., a bacterium isolated from acidic forest soil that catabolizes (+)-catechin and its putative aromatic derivatives. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61(2):249-254.

- Palleroni NJ. 1993. *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of gram-negative bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 64:231–251.
- Pankratov TA, LA Kirsanova, EN Kaparullina, VV Kevbrin, SN Dedys. 2012. *Telmatobacterbradus* gen. nov., sp. nov., a cellulolytic facultative anaerobe from subdivision 1 of the Acidobacteria, and emended description of *Acidobacterium-capsulatum*. Kishimoto et al. 1991. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62(2):430-437
- Patten CL, BR Glick. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology* 68:3795–3801
- Rosch C, H Bothe. 2005. Improved assessment of denitrifying, N₂-fixing, and total-community bacteria by terminal restriction fragment length polymorphism analysis using multiple restriction enzymes. *Applied and Environmental Microbiology* 71(4): 2026-2035.
- Saito N, M Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biological Evolution* 4:406-425.
- Salles JF, E Samyn, P Vandamme, JA Van Veen, JD Van Elsas. 2006. Changes in agricultural management drive the diversity of Burkholderia species isolated from soil on PCAT medium. *Soil Biology & Biochemistry* 38:661-673.
- Tamura K, J Dudley, M Nei, S Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Usche YM, H Valencia, H Pérez. 2004. Caracterización de bacterias y hongos solubilizadores de fosfato bajo tres usos de suelo en el sur del Trapecio Amazónico. *Acta Biológica Colombiana* 9(2):129
- Widdel F, G Kohring, F Mayer. 1983. Studies in dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. III. Characterization of the Filamentous gliding *Desulfonema-limicola* gen. nov. sp. nov., and *Desulfonema magnum* sp. nov. *Archives of Microbiology* 134: 286–294.
- Will C, A Thürmer, A Wollherr, H Nacke, N Herold, M Schruppf, J Gutknecht, T Wubet, F Buscot, R Daniel. 2010. Horizon-specific bacterial community composition of German grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 76(20):6751-6759.
- Wu M, X Zhang, H Zhang, Y Zhang, Y Li, Q Zhou. 2009. Chenggang Zhang. Soil *Pseudomonas* community structure and its antagonism towards *Rhizoctonia solani* under the stress of acetochlor. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 83:313-317.
- Yergeau E, KK Newsham, DA Pearce, GA Kowalchuk. 2007. Patterns of bacterial diversity across a range of Antarctic terrestrial habitats. *Environmental Microbiology* 9 (11):2670-2682
- Zchori-Fein E, SJ Perlman, SE Kelly, N Katzir, MS Hunter. 2004. Characterization of a “Bacteroidetes” symbiont in *Encarsia* wasps (Hymenoptera: Aphelinidae): proposal of “*Candidatus Cardinium hertigii*”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:961-968.



Micrografía electrónica de la bacteria *Tistlia consotensis*. Carolina Díaz Cárdenas



Micrografía electrónica que muestra agregados de una bacteria del género *Aurantimonas*.