

**DIVERSIDAD DE MICROORGANISMOS ENDÓFITOS Y SU PAPEL EN EL  
CICLO DE NITRÓGENO EN MACRÓFITAS FLOTANTES DEL HUMEDAL  
MEANDRO DEL SAY**

**Gina Marcela Saganome Rodríguez**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de Bióloga**

**Tutora**

**Lucia Cristina Lozano Ardila, PhD.**

**Coturora**

**Diana Alexandra Delgadillo Méndez, MSc.**

**UNIVERSIDAD DE LA SALLE**

**Departamento de Ciencias Básicas**

**Programa de Biología**

**Bogotá D.C.**

**Septiembre, 2016**

## **Agradecimientos**

A *Lucía Cristina Lozano* y a *Diana Alexandra Delgadillo* por su apoyo, confianza, dedicación durante esta investigación, por compartir todo su conocimiento y tiempo conmigo, a los laboratorios de la Universidad de La Salle por permitirme realizar el procesamiento de las muestras vegetales y al programa de Biología de la Universidad de La Salle por su apoyo financiero en la secuenciación de las muestras.

## Tabla de contenido

Resumen	4
Introducción	4
Métodos	7
<i>Área de estudio</i>	7
<i>Toma de muestras</i>	7
<i>Diversidad de microorganismos endófitos</i>	8
<i>Evaluación de los microorganismos endófitos que participan en el ciclo del nitrógeno</i>	9
<i>Identificación de los microorganismos endófitos</i>	10
Resultados	11
<i>Diversidad de microorganismos endófitos</i>	11
<i>Índices de diversidad Shannon y Margalef</i>	12
<i>Microorganismos endófitos en el ciclo del nitrógeno</i>	13
Discusión	14
<i>Diversidad de microorganismos endófitos</i>	14
<i>Microorganismos endófitos cultivables en el ciclo del nitrógeno</i>	16
Conclusiones	20
Bibliografía	21

# DIVERSIDAD DE MICROORGANISMOS ENDÓFITOS Y SU PAPEL EN EL CICLO DE NITRÓGENO EN MACRÓFITAS FLOTANTES DEL HUMEDAL MEANDRO DEL SAY

## RESUMEN

La ciudad de Bogotá se caracteriza por tener un elevado grado de urbanización, que comenzó con pequeños parches y actualmente está constituida por grandes matrices urbanizadas. Este fenómeno está poniendo en riesgo la viabilidad de los humedales de la ciudad. Un ejemplo es el humedal Meandro del Say, el cual presenta problemas como la afectación de la calidad de agua por aportes de aguas residuales (que contiene compuestos altamente nitrogenados). Sin embargo, existen comunidades de plantas que toleran estas alteraciones y que resultan claves para la descontaminación de los humedales, entre ellas algunas macrófitas flotantes. Su capacidad puede deberse a las interacciones que poseen con diversos microorganismos. El objetivo de esta investigación fue caracterizar la diversidad de microorganismos endófitos cultivables de *Lemna* sp. y *Azolla* sp. (dos macrófitas acuáticas) provenientes del humedal Meandro del Say e identificar los microorganismos endófitos que actúan en el ciclo de nitrógeno como oxidadores de amonio y nitrito. Para esto, se aislaron microorganismos endófitos cultivables presentes en *Lemna* sp. y *Azolla* sp. macerando 20 gramos de cada especie, se hicieron siembra en agar PDA y AN, posteriormente se seleccionaron los endófitos que actúan en el ciclo de nitrógeno para su identificación, las bacterias se identificaron mediante amplificación y secuenciación del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S y los hongos morfológicamente. Se obtuvo un total de 18 morfotipos de microorganismos endófitos cultivables, 8 morfotipos bacterianos para *Azolla* sp. y 8 morfotipos bacterianos y dos hongos miceliales para *Lemna* sp. En esta última se encontró un mayor índice de diversidad de Shannon, mientras que *Azolla* sp. presentó un mayor índice de diversidad de Margalef. Estos resultados indican que *Lemna* sp. presenta mayor riqueza de morfotipos bacterianos, y *Azolla* sp. presenta mayor abundancia por morfotipo bacteriano aislado. Adicionalmente, se encontraron 13 morfotipos endófitos con capacidad de oxidar amonio y nitrito, entre ellos dos hongos miceliales. Con respecto a los morfotipos endófitos oxidadores aislados de *Azolla* sp. se identificaron 6 morfotipos bacterianos: 4 pertenecen al phylum Proteobacteria, 1 al phylum Actinobacteria y 1 al phylum Bacteroidetes. Y con respecto a los morfotipos endófitos oxidadores aislados de *Lemna* sp., 3 morfotipos pertenecen al phylum Proteobacteria, 1 al phylum Actinobacteria. Los hongos miceliales se clasificaron en el género *Penicillium* sp. y *Cladosporium* sp. Los microorganismos caracterizados en este estudio se podrían utilizar para futuros estudios de biorremediación de compuestos nitrogenados en humedales.

## INTRODUCCIÓN

Los humedales son cuerpos de agua que actúan como reguladores de caudales de los ríos y sus afluentes, y son depósitos y reservorios naturales para la recolección de aguas lluvias en épocas de invierno (1). Estos ecosistemas son considerados como los más productivos del mundo, proveen múltiples beneficios, como la recarga y descarga de aguas subterráneas, control de inundaciones, retención de sedimentos tóxicos y no tóxicos, retención de nutrientes, estabilización de

microclimas, soporte de cadenas tróficas y constituyen hábitats para diversas especies de fauna y flora (2, 3).

Sin embargo, en las últimas décadas los procesos de urbanización han perturbado drásticamente los humedales, generando descargas de aguas residuales, acumulación de basuras, contaminación atmosférica debido a las altas emisiones de gases tóxicos como el dióxido de carbono, entre otros. Todo lo anterior ha generado modificaciones y alteraciones fisicoquímicas, en el cuerpo de agua de los humedales naturales, lo cual repercute en la composición, distribución y estructura de las comunidades que allí habitan (4).

A pesar de las problemáticas actuales de algunos humedales, existen comunidades de plantas capaces de tolerar las alteraciones generadas por contaminantes de origen industrial o doméstico (5). Entre ellas están algunas especies de macrófitas flotantes, que pueden resistir altos niveles de contaminación (por ejemplo, aquellos contaminantes que aportan fósforo y nitrógeno al agua). Investigaciones anteriores concluyeron que las macrófitas flotantes pueden usar compuestos contaminantes, que están constantemente en su hábitat para sus requerimientos nutricionales (6, 7). Por esta razón, durante los últimos años se han propuesto utilizar dichas especies con fines de biorremediación en humedales artificiales (8). Adicionalmente, se ha comprobado que los principales mecanismos de absorción de compuestos contaminantes por parte de las plantas están determinados por las interacciones que presentan con diversos microorganismos (5, 8, 9).

Algunas de estas interacciones entre plantas y microorganismos se pueden presentar endófitamente, esto quiere decir que microorganismos, como hongos y bacterias, viven en el tejido interno de la planta (raíz, tallo y/o hojas), sin causar ningún síntoma aparente de enfermedad (10). En este caso, la planta provee alimento, hospedaje y protección, y los microorganismos por su parte, proveen a la planta potencial adaptativo frente a condiciones adversas que generen estrés, ya sean de tipo biótico (plagas, patógenos, etc.) o abiótico (exceso de nitrógeno, fósforo, salinidad, pH, etc.) (11). Por su metabolismo, los microorganismos endófitos toman algunos compuestos orgánicos del agua y los usan como fuente de energía,

participando así en diferentes ciclos biogeoquímicos, entre ellos los que permiten el ciclaje de carbono, fósforo y nitrógeno (12).

El ciclo del nitrógeno es uno de los más importantes en los ecosistemas terrestres y acuáticos y consiste en cuatro procesos mediados por microorganismos: fijación de nitrógeno, mineralización (descomposición), nitrificación y desnitrificación (13). En el segundo y tercer proceso, bacterias y hongos juegan un papel importante, ya pueden tomar diferentes formas del nitrógeno orgánico e inorgánico presente en el agua y transformarlo, haciéndolo consumible para la planta en forma de amonio o nitrato (14, 15). Con respecto al proceso de nitrificación, este es indispensable en la remoción de nitrógeno orgánico de aguas residuales, y consiste en la oxidación biológica de amonio ( $\text{NH}_3$ ) (en presencia de oxígeno) a nitrito ( $\text{NO}_2$ ), luego el nitrito obtenido se oxida y se transforma en nitrato ( $\text{NO}_3$ ) (16).

Esta capacidad de los microorganismos endófitos para transformar las fuentes de nitrógeno presentes en los contaminantes en compuestos utilizables por las plantas, tiene un uso potencial para el manejo y remediación de los humedales en ciudades como Bogotá. Esta ciudad en particular cuenta con 14 humedales, que han sido afectados por factores como la descarga al cuerpo de agua de contaminantes de origen industrial y doméstico (aceites, metales pesados y compuestos altamente nitrogenados) (17, 3). Entre estos está el humedal Meandro del Say ubicado en la localidad de Fontibón, el cual actualmente presenta problemas como la afectación de la calidad de agua por aportes de aguas residuales, la limitación en la calidad y cantidad de agua que ingresa al humedal, la presencia y pastoreo de animales, entre otros (18, 19).

Dos de las especies de macrófitas flotantes que prevalecen en el humedal Meandro del Say son *Lemna* sp., y *Azolla* sp. La primera es una macrófita flotante que se nutre de residuos fosforados y nitrogenados que contaminan las aguas, retirando estos de manera continua del sistema acuático (20). Además, esta planta produce gran cantidad de biomasa, por lo cual podría aprovecharse como alternativa importante en nutrición animal (20). Por su parte, *Azolla* sp. es un helecho acuático con pequeñas hojas alternas que vive en simbiosis con cianobacterias que fijan el

nitrógeno atmosférico; al descomponerse pueden producir sustancias con efecto nematocida (21). Por lo tanto, las características de estas dos plantas pueden ser utilizadas con alta eficacia para mejorar la calidad de los ecosistemas acuáticos en los que habitan (21).

Sin embargo, tanto para el Meandro del Say como para los humedales del país se desconoce la diversidad de microorganismos endófitos asociados con dichas macrófitas flotantes y el papel de estos como oxidadores de amonio y nitritos, ya que al realizar una revisión de artículos en las bases de datos de *Pubmed*, *Sciencedirect* y *Scielo*, es evidente la ausencia de reportes de microorganismos endófitos de macrófitas flotantes en Colombia.

Los estudios de diversidad de microorganismos endófitos, y su papel en el ciclo del nitrógeno (como oxidadores de amonio y nitritos), son importantes para explorar los posibles usos de estas especies endófitas en futuros planes de fitorremediación de compuestos nitrogenados en humedales naturales contaminados (15). Por lo tanto, los objetivos de esta investigación son caracterizar la diversidad de microorganismos endófitos cultivables de *Lemna* sp. y *Azolla* sp. provenientes del humedal Meandro del Say e identificar los microorganismos endófitos que actúan en el ciclo de nitrógeno como oxidadores de amonio y nitrito.

## **METODOLOGÍA**

### **Área de estudio**

El humedal Meandro del Say se encuentra ubicado en la localidad de Fontibón al occidente de Bogotá, Colombia (4°40'28.08" N – 74°10'07.57" W) a 2600 m.s.n.m. y posee un área total de 26 hectáreas (22).

### **Toma de muestras**

Se colectaron 20 gramos de cada especie vegetal sana en dos sectores del humedal Meandro del Say (Punto 1 de muestreo: N4° 40.535' W74° 09.884' con altura:

2561msnm, Punto 2 de muestreo: N4° 40.584' W74° 09.925' con altura: 2561msnm). De cada sector se tomaron dos muestras por especie vegetal para obtener una muestra compuesta de *Azolla* sp. y *Lemna* sp. y estas fueron depositadas en bolsas de polietileno con cierre hermético estériles y trasladadas al laboratorio de microbiología de la Universidad de La Salle. Adicionalmente y con el fin de hacer una caracterización parcial de la calidad de agua del humedal Meandro del Say, se tomó una muestra de agua, para hacer un posterior análisis fisicoquímico en el laboratorio “Doctor Calderón” donde fueron analizados: sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, cloruros, sulfatos, carbonatos, nitratos y fosfatos.

### **Diversidad de microorganismos endófitos**

Con el fin de determinar la diversidad de microorganismos endófitos cultivables presentes en *Azolla* sp. y *Lemna* sp., se realizó un aislamiento basado en el método propuesto por Phillips *et al.* (23). Este método consistió en la esterilización del material vegetal por lavados secuenciales con etanol al 70% por 60 segundos, hipoclorito de sodio al 1% por 90 segundos y 5 lavados con agua destilada estéril. Para evaluar el proceso de desinfección, se sembraron 100 µL del último enjuague en una caja de petri con AN (Agar Nutritivo) para bacterias y agar PDA (Agar Papa Dextrosa) para hongos.

Posteriormente, cada muestra vegetal se maceró en un mortero estéril con buffer Fosfato (pH 7,4). Con el extracto resultante se realizaron diluciones seriadas las cuales se sembraron en placas de Petri con AN y PDA. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 15 días. Luego del tiempo de incubación se realizó un recuento diferencial de cada morfotipo de bacteria u hongo para calcular riqueza, abundancia e índice de diversidad de Shannon (H) y Margalef (DMg) (24). Finalmente se hicieron pases de los diferentes morfotipos de colonia a una nueva placa de petri de AN o PDA para bacterias y hongos respectivamente, con el fin de tener las cepas puras de cada microorganismo.



## Evaluación de los microorganismos endófitos que participan en el ciclo del nitrógeno

A partir de los aislamientos realizados en la etapa anterior, se llevó a cabo una siembra por agotamiento en cuatro diferentes medios de cultivo selectivos para microorganismos oxidadores de amonio y nitrito tanto autótrofos, como heterótrofos (tabla 1). Para los heterótrofos se adicionó una fuente de carbono (acetato de sodio). Estos medios fueron modificados de los medios reportados por Watson & Mandel (25) y ajustados a pH 7,5.

**Tabla 1.** Composición de medios nitrogenados. (A) Medio para seleccionar oxidadores de amonio autótrofos. (B) Medio para seleccionar oxidadores de nitritos autótrofos. (C) Medio para seleccionar oxidadores de amonio heterótrofos. (D) Medio para seleccionar oxidadores de nitrito heterótrofos. Tomado y modificado de Watson & Mandel (25)

FUNCIÓN	COMPONENTE	Medios			
		A	B	C	D
Solución de sales	NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	100µg/l			
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	200µg/l			
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2µg/l			
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	100µg/l			
	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	20µg/l			
Hierro quelado		0,5 ml/l			
Fuente de nitrógeno	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,7g/l	-	1,7g/l	-
	NaNO <sub>2</sub>	-	690mg/l	-	690mg/l
Fuente de carbono	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> ONa	-	-	1g/l	1g/l
pH		7,5			

Las siembras se incubaron a temperatura ambiente durante 15 días, y al finalizar el tiempo de incubación se realizó un segundo pase a partir de la primera siembra con el fin de comprobar que los microorganismos están creciendo debido la fuente de nitrógeno adicionada a cada medio y no por reservas metabólicas presentes en cada microorganismo.

## Identificación de los microorganismos endófitos

Las cepas bacterianas se identificaron por amplificación y secuenciación del ADN que codifica para el ARN ribosomal 16S siguiendo la metodología reportada por Lozano & Dussán (26). Se tomó media colonia de cada una de las cepas aisladas y se depositó en 50 µL de agua de PCR, posteriormente las muestras se calentaron a 90°C durante 15 minutos y se centrifugaron por 5 minutos a 14.000 r.p.m.

Para la amplificación del ADN se preparó una mezcla conteniendo: buffer para la Taq polimerasa 1x, MgCL<sub>2</sub> 2,5-3 mM, dNTPs 0,2 mM, cebadores 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1493R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') 0,2 mM cada uno, Taq DNA polimerasa (Go taq Promega) 0,25µL por cada muestra y agua miliQ para completar 25 µL. Se amplificó 2 µL de extracto crudo de ADN.

La amplificación por PCR se realizó en un termociclador (Eppendorf), con desnaturalización inicial de 95°C durante 3 minutos, seguido de 25 ciclos de amplificación (95°C durante 45 segundos, 50°C durante 60 segundos, 72°C durante 80segundos) y una etapa de extensión final de 72°C durante 7 minutos.

Las secuencias obtenidas se compararon con las disponibles en la base de datos *GenBank* utilizando BLASTn (27) y RibosomalDatabase Project II (RDP II), que incluye un programa denominado "clasificador" (28). Las cepas que se clasificaron en el mismo género tras el análisis filogenético basado 16S en el ADN que codifica para el ARN ribosomal 16S, se relacionaron las secuencias entre la cepa aislada y los parientes filogenéticos más cercanos usando <https://www.arb-silva.de/aligner/> (29).

Las cepas de hongos se identificaron mediante su morfología macro y microscópica haciendo uso de claves de identificación (30).

## RESULTADOS

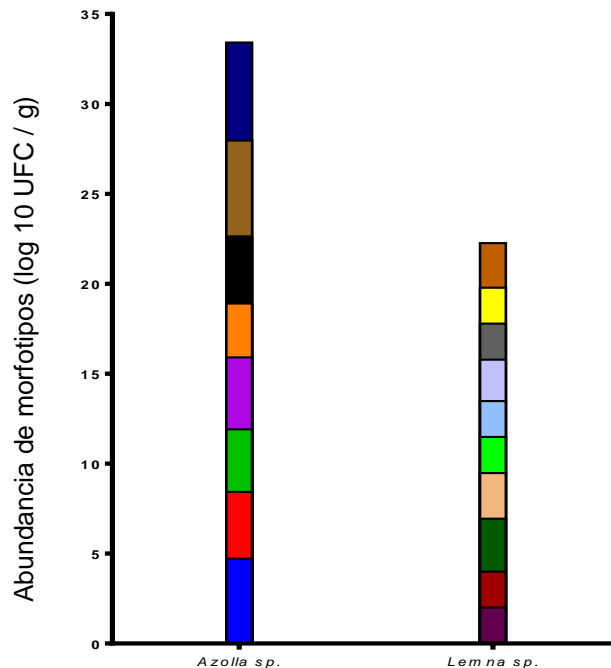
Se obtuvieron valores de parámetros fisicoquímicos del agua el día del muestreo, de las dos muestras, los cuales fueron sodio (77,57 y 71,07 mg/L), potasio (24,62 y 42,60 mg/L), calcio (158,67 y 240,01 mg/L), magnesio (16,03 y 32,31 mg/L), amonio (0,6 y 1,6 mg/L), cloruros (76,57 y 104,93 mg/L), sulfatos (8,64 y 46,10 mg/L), carbonatos (0 y 0 mg/L), nitratos (1,24 y 1,24 mg/L), fosfatos (4,37 y 5,89 mg/L). El análisis fisicoquímico mostró algunos valores fuera del rango normal permitido para los humedales de Cundinamarca. En el caso del amonio y nitratos, los valores están en el rango (0,1-2,0 mg/L y 1,0-5,0 mg/L respectivamente) lo que corresponde a un grado de contaminación moderada a alta (33); los fosfatos superan el valor de 0,5 mg/L. lo que indica un grado de contaminación alta a extrema (33).

El pH de las muestras analizadas fue 7,21 y 7,44; estos niveles están dentro del rango establecido de cuerpos de agua neotropicales (6,00-9,00) (31) y corresponde a valores similares a los reportados para los humedales Tibanica ( $6,93 \pm 0,14$ ), Jaboque ( $7,04 \pm 0,21$ ), Juan Amarillo ( $7,34 \pm 0,29$ ), Santa María del Lago ( $7,16 \pm 0,24$ ) y Guaymaral ( $7,09 \pm 0,32$ ) (32).

### Diversidad de microorganismos endófitos

Se aislaron un total de 18 morfotipos de microorganismos endófitos cultivables de las dos especies de macrófitas flotantes (*Azolla* sp. y *Lemna* sp.), dos de los morfotipos fueron hongos miceliales. En *Azolla* sp. se aislaron 8 morfotipos de bacterias endófitas, en *Lemna* sp. se aislaron 8 morfotipos de bacterias y 2 hongos endófitos.

Estas dos especies de macrófitas no comparten morfotipos microbianos en común, lo cual sugiere que los microorganismos endófitos presentes en *Azolla* sp. y *Lemna* sp. podrían ser específicos de cada planta (Figura 1). *Lemna* sp. presenta mayor riqueza de morfotipos microbianos comparada con *Azolla* sp., sin embargo, *Azolla* sp. presenta mayor abundancia de morfotipos microbianos que *Lemna* sp., ya que los morfotipos encontrados en *Azolla* sp. presentan un mayor recuento de individuos por morfotipo (figura 1).

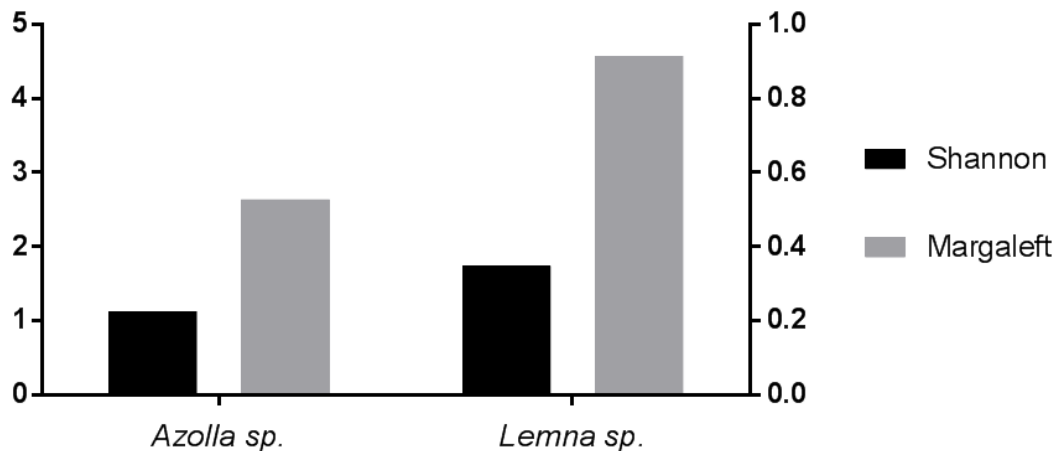


**Figura 1.** Abundancia de morfotipos microbianos (log 10 UFC / g) aislado de macrófitas flotantes (*Azolla sp.* y *Lemna sp.*) del humedal Meandro del Say. Los colores son asignados a cada morfotipo encontrado.

### Índices de diversidad Shannon y Margalef

Los índices calculados Shannon y Margalef evalúan la diversidad alfa (35). La diversidad alfa tiene en cuenta la riqueza y abundancia de morfotipos de una comunidad particular que se considera homogénea (35). El índice de Margalef tiene en cuenta la riqueza específica, es decir el número de especies y este se mide de 0 a 1. El índice de Shannon tiene en cuenta la cantidad de especies presente en el área de estudio y su homogeneidad en el ecosistema estudiado.

El índice de Shannon se mide de 0 a 5, siendo 0 diversidad nula y 5 alta diversidad. En la figura 3 se observa que los índices de Shannon y Margalef son mayores para *Lemna sp.*, ya que en *Azolla sp.* la abundancia de los morfotipos encontrados no es relativamente homogénea, es decir que, en esta planta el número de individuos por morfotipo presenta una gran variación. Por lo tanto, *Lemna sp.* al tener mayor número de morfotipos y mayor homogeneidad entre los individuos por morfotipos presenta mayores índices de diversidad (figuras 1 y 2).

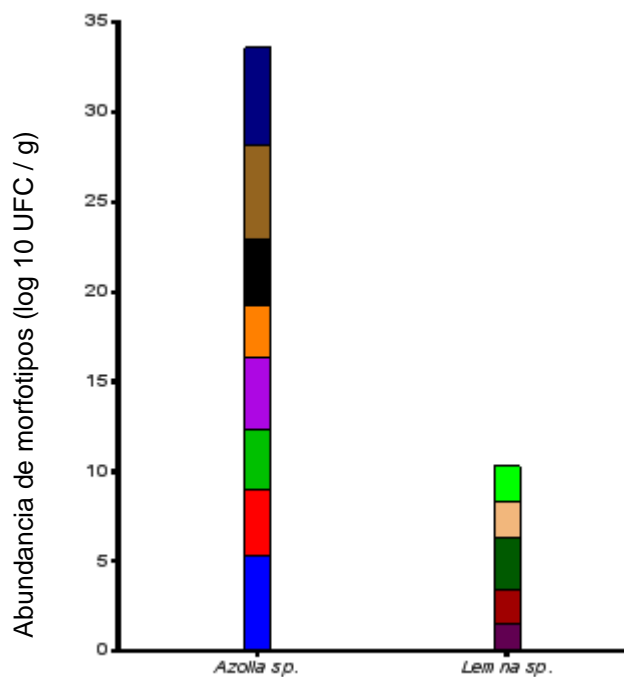


**Figura 2.** Índice de diversidad de Shannon y Margalef de morfotipos bacterianos cultivables aislados de dos especies de macrófitas flotantes (*Azolla sp.* y *Lemna sp.*) del humedal Meandro del Say. Eje izquierdo tiene la escala para Shannon y el eje derecho para Margalef.

### Microorganismos endófitos en el ciclo del nitrógeno

Varios microorganismos pueden aprovechar la energía disponible de la oxidación de compuestos inorgánicos, tales como el amonio y el nitrito (13). En esta investigación de los 18 morfotipos aislados, 13 participan en el ciclo del nitrógeno, actuando como oxidadores de amonio y nitrito.

Todos los microorganismos encontrados en *Azolla sp.* y 5 de los presentes de *Lemna sp.* (2 hongos y 3 bacterias) tienen la capacidad de oxidar amonio y nitrito (figura 3). De los 13 morfotipos endófitos con capacidad de oxidar amonio y nitrito se identificaron 12 morfotipos (de un morfotipo no fue posible obtener colonias puras), 5 morfotipos de *Azolla sp.* son pertenecientes al Phylum Proteobacteria, 1 al Phylum Actinobacteria y 1 al Phylum Bacteroidetes. En *Lemna sp.* 2 morfotipos pertenecen al Phylum Proteobacteria, 1 al Phylum Actinobacteria, y dos hongos miceliales se clasificaron en el género *Penicillium sp.* y *Cladosporium sp.*



**Figura 3.** Abundancia de morfotipos microbianos oxidadores de nitrito y amonio (log 10 UFC / g) aislados de macrófitas flotantes (*Azolla sp.* y *Lemna sp.*) del humedal Meandro del Say. Los colores son asignados a cada morfotipo.

## DISCUSIÓN

Los análisis fisicoquímicos realizados dictan una idea del estado de la calidad del agua del humedal Meandro del Say. Sin embargo, este no debe ser tomado como resultado certero del estado actual del cuerpo de agua del humedal, debido a que los parámetros medidos en este estudio varían según las condiciones climáticas, relacionadas con periodos de lluvia y sequía (34) y en este caso solo se realizaron los análisis de las muestras tomadas el día de muestreo.

### Diversidad de microorganismos endófitos

Fidalgo *et al.* (36) obtuvieron un total de 665 morfotipos endófitos de *Halimione portulacoides*. *H. portulacoides* abundante en marismas donde hay acumulación de mercurio (Hg), se ha propuesto que pueden ser útiles fitorremediación y la biomonitorización de ecosistemas contaminados. La diversidad de microorganismos

endófitos reportados en este estudio es menor a lo reportado en Fidalgo *et al.* (36) y en otras investigaciones de microorganismos endófitos de plantas acuáticas y terrestres.

Esto pudo ser debido a varios factores, el principal es la morfología de la planta y su hábitat natural, también factores metodológicos, uno de ellos es el proceso de esterilización de la parte externa de las muestras, este pudo influir en la viabilidad de los endófitos aislados ya que al hacer los lavados secuenciados con etanol al 70% por 60 segundos e hipoclorito de sodio al 1% por 90 segundos, estos compuestos pudieron haber entrado a los tejidos internos de la planta y afectar la viabilidad de algunos microorganismos (36). Válega *et al.*, (37) sugieren que otros factores importantes son: la variación de los compuestos del medio natural como el contenido de agua, contenido de materia orgánica, el pH y la conductividad a lo largo de las épocas del año también puede influir en el número de aislamientos de endófitos cultivables.

Sin embargo, el Humedal Meandro del Say carece de datos detallados y confiables como lo son, datos hidráulicos, ecológicos de fauna y flora, de los sistemas de flujo que ingresan al cuerpo de agua, datos físicos, químicos y biológicos, entre otros. En las peores épocas de sequía (diciembre, enero, febrero y marzo) en el humedal se registran especies de aves y algunos mamíferos terrestres que aprovechan los pocos recursos hídricos que posee el Meandro del Say, por lo tanto es fundamental la mejora constante de este ecosistema.

Zheng *et al.* (38), encontraron mayor riqueza de especies bacterianas endófitas presente en *Azolla microphylla* que supera el número de morfotipos reportadas en este estudio, lo anterior puede ser debido a que la técnica usada (PCR-DGGE), permite visualizar todas las especies endófitas (especies cultivables y no cultivables) presentes en *Azolla microphylla*. A diferencia de esta metodología, en el presente estudio únicamente se aislaron los microorganismos cultivables, los cuales pertenecen solo a una mínima fracción de la diversidad real, ya que este estudio se centró en aislar especies endófitas cultivables para futuros estudios de biorremediación en humedales naturales.

En este estudio, se reportaron dos cepas de hongos con igual abundancia de individuos. Uno de ellos, *Cladosporium*, ha sido reportado como el género endófito dominante de especies acuáticas y terrestres como, *Azadirachta indica*, *Ottelia acuminata*, *Myriophyllum verticillatum*, *Cardamine multijuga*, *Equisetum arvense* y *Impatiens chinensis* (39, 40). El género *Cladosporium* es de gran importancia ya que ha sido ampliamente conocido como depósito de nuevos metabolitos secundarios con amplia diversidad estructural que le brindan a la planta protección y resistencia contra herbívoros y/o microorganismos fitopatógenos (41); además, tienen la capacidad de oxidar amonio y nitrito, aportando a plantas hospedadoras resistencia al estrés de los ambientes acuáticos contaminados (40).

La otra cepa de hongo aislado corresponde al género *Penicillium*, el cual representa uno de los taxones más frecuentemente reportado en estudios de hongos endófitos, debido a que muchas de las especies de este género tienen la capacidad de adaptarse a varias condiciones ambientales (42); además este género también es conocido por su producción de metabolitos secundarios bioactivos y por sus efectos de control biológico de plagas en plantas de *Coffea* sp. (42).

### **Microorganismos endófitos cultivables en el ciclo del nitrógeno**

Todas las cepas identificadas en este estudio han sido reportadas como microorganismos endófitos en estudios anteriores (tabla 2), y sus usos en planes de remediación en cuerpos de agua contaminada inician desde la degradación de pesticidas, biodegradación de derivados de petróleo, reducción de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), fitorremediación de agua eutrofizada hasta promoción de crecimiento vegetal.

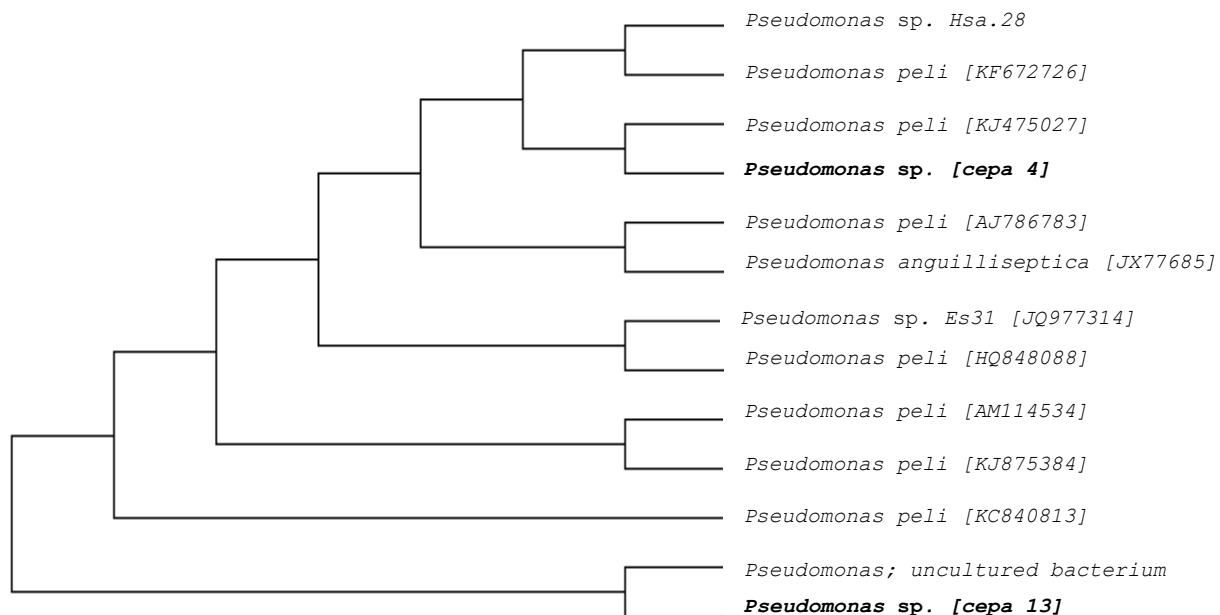


**Tabla 2.** Identificación de cepas con capacidad de oxidar amonio y nitrito aisladas de *Azolla* sp. y *Lemna* sp.

<b>Cepa</b>	<b>Organismo cercano</b>	<b>Origen</b>	<b>Uso potencial</b>	<b>Referencia<sup>1</sup></b>
1	<i>Chryseobacterium</i> sp.	<i>Azolla</i> sp.	PGPB <sup>2</sup> , Reducción de nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) a nitrito (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) (43).	43
3	<i>Variovorax</i> sp.	<i>Azolla</i> sp.	Biodegradación de derivados de petróleo, Reducción de nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) a nitrito (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) (44).	45
4	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Azolla</i> sp.	Reducción de nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) a nitrito (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ), PGPB (46).	47
7	<i>Brevundimonas</i> sp.	<i>Azolla</i> sp.	PGPB, Reducción de nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) a nitrito (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) (48).	45
10	Orden Burkholderiales	<i>Azolla</i> sp.	PGPB, Fitorremediación de agua eutrofizada, Reducción de nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) a nitrito (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) (49).	49
5	<i>Gordonia</i> sp.	<i>Azolla</i> sp.	Remoción de Diésel, síntesis de sideróforos, PGPB, Reducción de nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) a nitrito (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) (50).	51
13	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Azolla</i> sp.	Reducción de nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) a nitrito (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ), PGPB (46).	48
14	<i>Microbacterium</i> sp.	<i>Lemna</i> sp.	PGPB, Reducción de nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) a nitrito (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) (36).	51,52,47
17	<i>Brevundimonas</i> sp.	<i>Lemna</i> sp.	PGPB, Reducción de nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) a nitrito (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) (48).	45
20	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Lemna</i> sp.	Reducción de nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) a nitrito (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ), PGPB (53).	53

<sup>1</sup>Referencia del reporte de especie como microorganismo endófito, <sup>2</sup>PGPB: Promoción de crecimiento vegetal.

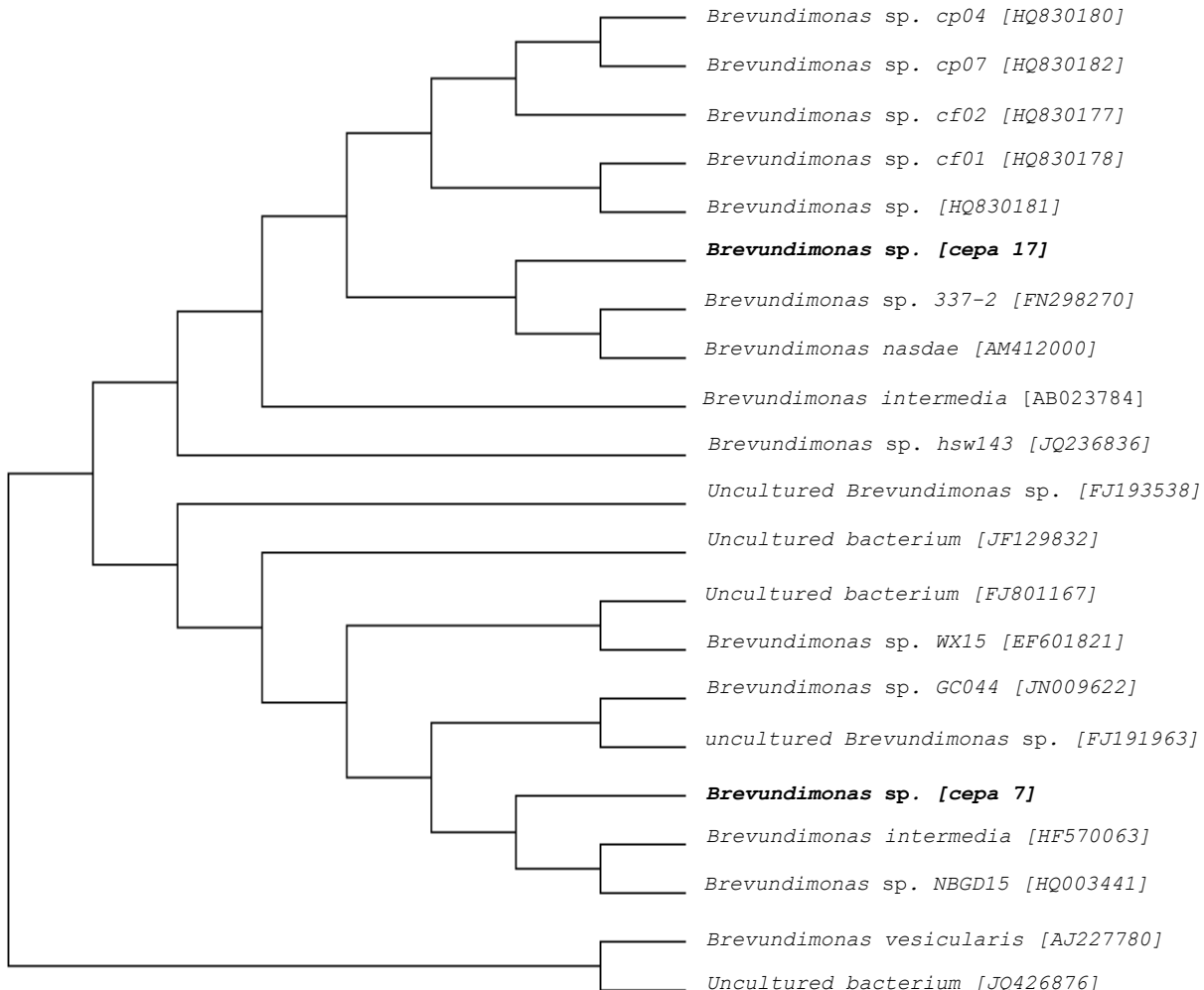
*Azolla* sp. y *Lemna* sp., comparten un género de bacteria endófitas en común (*Brevundimonas* sp.) y *Azolla* sp. tiene dos bacterias endófitas que pertenecen al mismo género (*Pseudomonas* sp.). En la figura 4 y 5 se observan las especies relacionadas más cercanas y las cepas mencionadas anteriormente, lo que sugiere que no son asilamientos de una misma cepa.



**Figura 4.** Árbol filogenético de dos especies del género *Pseudomonas* (cepa 4 y 13) aisladas de *Azolla* sp. y sus parientes filogenéticos más cercanos, construidos sobre la base de la secuencia del gen 16S rADN.

*Pseudomonas peli* es una de las especies relacionadas más cercana en el análisis filogenético de las cepas 4 y 13 (figura 4), esta es una bacteria Gram-negativa que no forma esporas, su morfología de colonia se caracteriza por ser lisa, redonda con bordes irregulares y de color beige a amarillo (54). Las células son móviles, es oxidasa y catalasa positiva y se caracteriza por reducir nitratos (54). *Pseudomonas peli* se ha aislado de inóculos de microorganismos nitrificantes (54), y se ha reportado su capacidad de degradar clorpirifós (es un insecticida que dependiendo de la cantidad y duración de la exposición, puede producir efectos sobre el sistema

nervioso, desde dolores de cabeza, visión borrosa, y salivación hasta convulsiones, coma y la muerte) (55).



**Figura 5.** Árbol filogenético de dos especies del genero *Brevundimonas* (cepa 7 y 17) aisladas de *Azolla* sp. y *Lemna* sp. respectivamente y sus parientes filogenéticos más cercanos, construidos sobre la base de la secuencia del gen 16S rADN.

Las especies de *Brevundimonas* sp. son no fermentadoras de lactosa, aeróbicas, no esporuladas y móviles; son microorganismos ambientales con distribución mundial aislados de agua, suelo, plantas y en algunos casos clínicos (56). Algunas especies del género *Brevundimonas* se han usado para purificar y disminuir desechos industriales como por ejemplo, los nitratos y estrógenos liberados al agua,

o los niveles de CO<sub>2</sub> liberados a la atmósfera y responsables del llamado efecto invernadero (56). También ha sido ampliamente usado en actividades promotoras del crecimiento vegetal, en plantas de trigo y de algodón (48). Debido a las características de estas especies y de todas las aisladas en *Azolla* sp. y *Lemna* sp. es importante evaluar estas todas las posibles aplicaciones en futuros estudios.

## **CONCLUSIONES**

Existen comunidades de microorganismos endófitos que interactúan constantemente con macrófitas flotantes en el humedal Meandro del Say, sin embargo la información disponible de la diversidad de microorganismos endófitos (cultivables y no cultivables) es realmente escasa para este y para los humedales de Cundinamarca.

La mayoría de microorganismos endófitos reportados e identificados en este estudio participan en el ciclo de nitrógeno como oxidadores de amonio y nitrito, y son especies con un gran potencial de biorremediación para futuras investigaciones.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Rincón E. (2001). Determinación de los principales parámetros fisicoquímicos e identificación de las morfofamilias de macroinvertebrados en dos estaciones del humedal de Córdoba. (Tesis de pregrado en Biología). *Universidad Distrital Francisco José de Caldas de Bogotá*. 45-50.
2. Mitsch W. (1994). Global Wetlands old world and new. (Primera edición) *Elsevier Science & Technology Books*. 848-856.
3. Simsa A., Zhanga Y., Gajaraja S., Brownb P. y Hua Z. (2013). Toward the development of microbial indicators for wetland assessment. *Water Research*. (47)1711-1725.
4. Azous A. y Horner R. (2001). Wetlands and urbanization: implications for the future. (Primera edición), *Florida: Lewis Publishers*. 5-15.
5. Zhu L., Li Z. y Ketola K. (2011). Biomass accumulations and nutrient uptake of plants cultivated on artificial floating beds in China's rural area. *Ecological Engineering*. (37)1460-1466.
6. Shehzadi M., Afzal M., Umar M., Islam E., Mobin A., Anwar S., Mahmood Q. (2014). Enhanced degradation of textile effluent in constructed wetland system using *Typhadomingensis* and textile effluent-degrading endophytic bacteria. *Water research*. (58) 152-159.
7. Tanner C. y Headley T. (2011). Components of floating emergent macrophyte treatment wetlands influencing removal of storm water pollutants. *Ecological Engineering*. (37) 474–486.
8. Sandberg D., Battista L. y Arnold E. (2014). Fungal endophytes of aquatic macrophytes: Diverse host-generalists characterized by tissue preferences and geographic structure. *Microbial Ecology*. (67) 735–747.
9. Ho Y., Hsieh J. y Huang C. (2013). Construction of a plant–microbe phytoremediation system: Combination of vetiver grass with a functional

endophytic bacterium, *Achromobacterxylosoxidans*F3B, for aromatic pollutants removal. *Bioresource Technology*. (145) 43–47.

10. Kukla M., Płociniczak T. y Piotrowska-Seget Z. (2014). Diversity of endophytic bacteria in *Loliumperenne* and their potential to degrade petroleum hydrocarbons and promote plant growth. *Chemosphere*. (117) 40–46.
11. Abello J y Kelemu S. (2006). Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas. *Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. (7) 55-57.
12. Madigan M., Martinko J., Stahl D., y Clark D. (2011). Nutrient Cycles, Biodegradation, and Bioremediation. Brock, *Biology of Microorganisms*. (Treceava edición). *Pearson*. 699-703.
13. Hayatsu M., Tago K. y Saito M. (2008). Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition*. (54) 33-45
14. Brader G., Compant S., Mitter B., Trognitz F. y Sessitsch A. (2014). Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. (27) 30–37.
15. Wei Y., Hou H., ShangGuan Y., Li J. y Li F. (2014). Genetic diversity of endophytic bacteria of the manganese-hyperaccumulating plant *Phytolaccaamericana* growing at a manganese mine. *European Journal of SoilBiology*. (62) 15–21.
16. Schmidt I., Sliemers O., Schmid M., Bock E., Fuerst J., Kuenen JG., Jetten MS. y Strous M. (2003). New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiology*. (4) 481-92.
17. Abarca H. (2007). El uso de macroinvertebrados como Bioindicadores de la calidad del agua. *Biocenosis*. (20) 1-2.
18. Moreno V. y Villalba J. (2003). Descripción general de los humedales de Bogotá, D.C. Sociedad geográfica de Colombia-Academia de ciencias geográficas.

Extraído de <http://www.sogeocol.edu.co/documentos/humed.pdf> el día 10 de Septiembre de 2014.

19. Contraloría. (2010). Informe de auditoría gubernamental con enfoque integral Modalidad especial a la gestión ambiental de los humedales Tibánica, Techo, Burro, La Vaca, Meandro del Say y Capellanía. Extraído de <http://pqr.contraloriabogota.gov.co> el día 15 de Septiembre de 2014.
20. Ortega H. (2005). Un estudio simplificado de la evolución de la *Lemna* sp. *Universidad, ciencia y tecnología*. (9) 119-123.
21. Castro R., Rodríguez M., Alvares M., Gil M. Novo R. y Castro R. (2009). Efecto de la incorporación del abono verde *Azolla* sp. En la reducción de los daños causados por fitonematodos en cultivos de organopónicos. *Cultivos tropicales*. (30) 10-13.
22. Plan de manejo ambiental del parque ecológico distrital Humedal Meandro del Say (2015). Extraído de [http://ambientebogota.gov.co/c/document\\_library/get\\_file?uuid=800d4bd2-db42-483d-996a-b423e91cfe85&groupId=3564131](http://ambientebogota.gov.co/c/document_library/get_file?uuid=800d4bd2-db42-483d-996a-b423e91cfe85&groupId=3564131) el día 10 de Septiembre de 2015
23. Phillips L., Germida J., Farrell R. y Greer C. (2008). Hydrocarbon degradation potential and activity of endophytic bacteria associated with prairie plants. *Soil Biology & Biochemistry*. (40) 3054-3064.
24. Magurran A. (2005). Biological diversity. *Current Biology*. (15) 116–118.
25. Watson S. y Mandel M. (1971). Comparison of the morphology and deoxyribonucleic acid composition of 27 strains of nitrifying bacteria. *Journal of Bacteriology*. (107) 563-569.
26. Lozano L. y Dussan J. (2013). Metal tolerance and larvicidal activity of *Lysinibacillus sphaericus*. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. (29) 1383-1389.

27. Altschul F., Madden L., Schaffer A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. (25) 3389-402.
28. Wang G., Garrity M., Tiedje J. Cole J. (2007). Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied Environmental Microbiology*. (73) 5261-5267.
29. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*. (41) 590-596.
30. Cepero M. (2012). Biología de hongos. (Primera edición). *Editorial Universidad de los Andes*. Bogotá, Colombia.
31. Roldán P. (1992). Fundamentos de Limnología Neotropical. (Primera edición) *Editorial Universidad de Antioquia. Colección Ciencia y Tecnología*. Bogotá, Colombia.
32. Castro-Roa D. y Pinilla-Agudelo G. (2014). Periphytic diatom index for assessing the ecological quality of the Colombian Andean urban wetlands of Bogotá. *Limnetica*. (33) 297-312.
33. López R. (2012). Estado trófico de un humedal urbano andino tropical: Santa María del Lago Bogotá D. C. Colombia. (Primera edición). *Editorial Universidad militar nueva granada*. Bogotá, Colombia.
34. Álvarez-León R. (2009). Notas sobre la avifauna del humedal Santa María del lago, cordillera Oriental de los Andes colombianos. *Revista Luna Azul*. 1909-2474.
35. Moreno E. (2001). Métodos para medir la biodiversidad. *M&T–Manuales y Tesis SEA*. (1) 84.



36. Fidalgo C., Henriques I., Rocha J., Tacão M. y Alves A. (2016). Culturable endophytic bacteria from the salt marsh plant *Halimione portulacoides*: phylogenetic diversity, functional characterization, and influence of metal (loid) contamination. *Environmental Science and Pollution Research*. (23) 10200-10214.
37. Válega M., Lillebø A., Pereira M., Duarte A. y Pardal M. (2008). Long-term effects of Mercury in a salt marsh: hysteresis in the distribution of vegetation following recovery from contamination. *Chemosphere*. (71) 765–772.
38. Zheng S., Chen B., Guan X. y Zheng W (2008). Diversity analysis of endophytic bacteria within *Azolla microphylla* using PCR-DGGE and electron microscopy. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*. (5) 269-276.
39. Verma V., Gond S., Kumar A., Kharwar R. y Strobel G. (2007). The endophytic mycoflora of bark, leaf, and stem tissues of *Azadirachta indica* A. Juss (neem) from Varanasi (India). *Microbial Ecology*. (54) 119-25.
40. Li H., Zhao C., Liu C. y Xu X. (2010). Endophytic fungi diversity of Aquatic/Riparian plants and their antifungal activity in vitro. *The Journal of Microbiology*. (48) 1-6.
41. Sánchez-Fernández R., Sánchez-Ortiz B., Sandoval-Espinosa Y., Ulloa-Benítez A., Armendáriz-Guillén B., García-Méndez M. y Macías-Rubalcava M. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. (2) 132-146.
42. Nicoletti R., Fiorentino A. y Scognamiglio M. (2014). Endophytism of *Penicillium* species in woody plants. *The Open Mycology Journal*. (8) 1-26.
43. Jeong J., Park B., Park H., Choi I., y Kim D. (2016). Draft genome sequence of *Chryseobacterium* sp. Strain GSE06, a Biocontrol Endophytic bacterium isolated from Cucumber (*Cucumis sativus*). *Genome Announcements*. (4) 00577–16.

44. Prasad B. y Suresh S. (2012). Biodegradation of dimethyl phthalate, diethyl phthalate, dibutyl phthalate and their mixture by *Variovorax sp.*. *International Journal of Environmental Science and Development*. (3) 283-288.
45. Manter D., Delgado J., Holm D. y Stong R. (2010). Pyrosequencing reveals a highly diverse and cultivar-specific bacterial endophyte community in potato roots. *Microbial Ecology*. (60) 157-166.
46. Widnyana K. y Javandira C. (2006). Activities *Pseudomonas spp.* and *Bacillus sp.* to Stimulate Germination and Seedling Growth of Tomato Plants. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. (9) 419-423.
47. Zakhia F., Jeder H., Willems A., Gillis M., Dreyfus B. y Lajudie P. (2006). Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for nifH-like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. *Microbial Ecology*. (51) 375-393.
48. Kumar V. y Gera R. (2014). Isolation of a multi-trait plant growth promoting *Brevundimonas sp.* and its effect on the growth of Bt-cotton. *3 Biotech* (4) 97-101
49. Santoyoa G., Moreno-Hagelsiebb G., Orozco-Mosquedac M. y Glickc B. (2016). Plant growth-promoting bacterial Endophytes. *Microbiological Research*. (183) 92-99.
50. Hong S., Ryu H., Kim J. y Cho S. (2010). Rhizoremediation of diesel-contaminated soil using the plant growth-promoting *rhizobacterium Gordonia sp. S2RP-17*. *Biodegradation*. (22) 593-601.
51. Qin S., Li J., Chen H., Zhao G., Zhu W., Jiang C. y Li W. (2009) ). Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. *Applied and Environmental Microbiology*. (75) 6176-6186.

52. Rhoden S., Garcia A., Santos-Silva M., Azevedo J. y Pamphile J. (2015). Phylogenetic analysis of endophytic bacterial isolates from leaves of the medicinal plant *Trichilia elegans* A. Juss. (Meliaceae). *Genetics and Molecular Research*. (14) 1515-1525.
53. Kittiwongwattana C. y Thawai C. (2014). *Rhizobium lemnae* sp. nov., a bacterial endophyte of *Lemna aequinoctialis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. (64) 2455-2460.
54. Vanparys B., Heylen K., Lebbe L. y De Vos P. (2006). *Pseudomonas peli* sp. nov. and *Pseudomonas peliborboris* sp. nov., isolated from a nitrifying inoculum. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. (56) 1875-1881.
55. ATSDR. (1997). Clorpirifos. Obtenido el día 9 de abril del 2016 de [http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es\\_tfacts84.pdf](http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts84.pdf)
56. Restrepo M., Granda P., Saldarriaga C., Pinto L. y Velásquez C. (2010). Reactive arthritis associated with *Brevundimonas diminuta* bacteremia. *Revista colombiana de reumatología*. (17). 245-248.