

Bacterias del suelo asociadas a plantaciones de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* Schrad. ex Wendl.

Mileidy Cruz-Martín^{1*}, Yelenys Alvarado-Capó¹, Mayra Acosta-Suárez¹, Berkis Roque¹, Cynthia Sánchez-García¹, Michel Leiva-Mora¹, Marisol Freire-Seijo¹, Manuel Alfonso Mariño². *Autor para correspondencia

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: mileidy@ibp.co.cu

²Empresa Forestal Integral. Buen Viaje y Río No. 176 Santa Clara, Cuba

RESUMEN

Se conoce que *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* es una especie que protege el suelo y tiene múltiples aplicaciones. Para demostrar su impacto sobre el ambiente se requiere identificar los microorganismos asociados a sus plantaciones, entre los cuales las bacterias juegan un papel fundamental. Este trabajo tuvo como objetivos: cuantificar, caracterizar e identificar las bacterias del suelo asociadas a plantaciones de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris*. Se emplearon muestras de suelo de una plantación de *B. vulgaris* var. *vulgaris* de 4 años de cultivo, así como de *Cecropia peltata* L. y de suelo sin cultivo para control. Para cuantificar el número de bacterias cultivables presentes se utilizó el método de conteo en placa en medios de cultivo selectivos para fijadores de nitrógeno y solubilizadores de fósforo. Se aislaron las colonias con características culturales diferentes y se les realizó una caracterización morfológica, cultural y fisiológica. Como resultado, se comprobó la presencia de comunidades bacterianas en orden similar a las encontradas en la otra especie y en suelo sin cultivar. Además, se observó crecimiento de colonias bacterianas en el medio de cultivo selectivo para fijadores de nitrógeno y solubilizadores de fósforo y se identificaron siete cepas como *Bacillus*. Los resultados alcanzados constituyen un punto de partida para trabajos de ecología microbiana en *B. vulgaris* var. *vulgaris*.

Palabras clave: bambú, cuantificación de microorganismos, rizosfera

ABSTRACT

It is known that *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* is a species that protects the soil and has many other applications. Identifying the microorganisms in their plantations, including bacteria that play a key role are required to demonstrate their impacts on the environment. This work was aimed to quantify, characterize and identify soil bacteria associated to plantations of *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris*. Soil samples were taken from a plantation of *B. vulgaris* var. *vulgaris* with 4 years of culture, *Cecropia peltata* L. and uncultivated soil as control. To quantify the number of cultivable bacteria present, the plate count method was used in selective culture media for bacteria that fix nitrogen and solubilise phosphorus. Colonies with different cultural characteristics were isolated and a morphological, physiological and cultural characterization was done. As a result, we verified the presence of bacterial communities in similar orders to those found in other species and uncultivated soil. In addition, growth of bacterial colonies was observed in selective culture medium for fixing nitrogen and solubilising phosphorus. Seven strains were identified as *Bacillus*. The results achieved are a starting point to work on microbial ecology in *B. vulgaris* var. *vulgaris*.

Keywords: bamboo, microorganism quantification, rhizosphere.

INTRODUCCIÓN

Está ampliamente demostrado que miembros de cualquier grupo de microorganismos puede desarrollar importantes funciones en el ecosistema (Giri *et al.*, 2005). Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre microbiología, especialmente los relacionados en describir las interacciones microbianas de cooperación, se han centrado en los hongos y las bacterias (Bowen y Rovira, 1999). Estas últimas, han sido

objeto de interés desde 1888 cuando Martinus Beijerinck descubrió que los nódulos bacterianos en las raíces eran cruciales para la obtención, por parte de las legumbre, nitrógeno del aire y han sido empleadas por décadas para favorecer la producción de cultivos (Beattie, 2007) Las principales funciones que se han descrito de las bacterias son: suministrar nutrientes a los cultivos, estimular el crecimiento de plantas, por ejemplo, a través de la producción de hormonas vegetales, controlar o inhibir la actividad de los

patógenos de las plantas; mejorar la estructura del suelo, y bioacumulación o lixiviación microbiana de sustancias inorgánicas (Ehrlich, 1990). Más recientemente, las bacterias también se han utilizado en el suelo por la mineralización de los contaminantes orgánicos, es decir, la biorremediación de suelos contaminados (Zhuang *et al.*, 2007; Zaidi *et al.*, 2008). Sin embargo, su conocimiento está limitado por los métodos de aislamiento empleados y la incapacidad de cultivarlos todos en el laboratorio. Se conoce que aproximadamente solo el 1% de las poblaciones bacterianas del suelo pueden ser cultivadas por métodos estándar (Torsvik y Ovreas, 2002).

Bambusa vulgaris var. *vulgaris* es una especie de gran importancia económica. Sin embargo, hasta el presente existe poca información disponible sobre las comunidades microbianas asociadas a plantaciones de bambú (Li *et al.*, 2008), su impacto sobre el suelo y su biodiversidad. Es por ello que se requieren estudios que permitan identificar los microorganismos cultivables y no cultivables para comprender su papel y su contribución tanto al desarrollo del cultivo (solubilización de nutrientes, fijación de nitrógeno, excreción de reguladores del crecimiento, defensa ante patógenos, incremento de la capacidad de absorción de agua y nutrientes, etc.) como su impacto en el ambiente (degradadores de materia orgánica, producción de metabolitos secundarios, etc.).

Teniendo en cuenta estos criterios este trabajo tuvo como objetivos: cuantificar, caracterizar e identificar bacterias del suelo asociadas a plantaciones de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon muestras de suelo (pardo grisáceo sin carbonatos) de muestreos realizados en una plantación de *B. vulgaris* var. *vulgaris* de 4 años de cultivo, ubicada en la localidad «El Sijú» (Finca Forestal Integral) (Jibacoa, Manicaragua, Villa Clara) (Figura 1). Se tomaron muestras a la profundidad de 0-10 cm para análisis microbiológico a una distancia de 30 cm del plantón. Además, se tomaron muestras de suelo de otra especie vegetal (Yagruma, *Cecropia peltata* L.) así como de suelo sin vegetación para utilizarlos como control.

Para cuantificar el número de bacterias cultivables presentes en las muestras de suelo se utilizó el método de conteo en placa. Para ello se tomó 1g de suelo (tamizado y libre de raíces) de cada tratamiento (3) (suelo tomado a 30cm del plantón de *B. vulgaris*, a 30cm de *C. peltata* y de suelo sin cultivo) y se hicieron diluciones decimales. Se realizó el conteo de ufc/g de suelo en medio de cultivo selectivo para fijadores de nitrógeno (Medio de Winogradsky, libre de nitrógeno) (Krieg y Holt, 1984) y se verificó el crecimiento de solubilizadores de fosfatos en el medio de cultivo propuesto por Mehta y Nautiyal (2001).



Figura 1. Plantación de *B. vulgaris* var. *vulgaris* de 4 años de cultivo, ubicada en la localidad «El Sijú» (Finca Forestal Integral) (Jibacoa, Manicaragua, Villa Clara).

Las placas de Petri se incubaron a 28°C y oscuridad constante por 96 horas. Se cuantificó el número de colonias por placa y se calculó el número de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (ufc/g).

De las muestras analizadas se observaron las colonias crecidas y se seleccionaron las que poseían caracteres culturales diferentes para su aislamiento y purificación mediante el método de agotamiento por estrías para obtener colonias aisladas. Posteriormente fueron conservados a 4°C para su posterior identificación.

Con el objetivo de identificar las bacterias aisladas, se realizó una caracterización morfológica, cultural y fisiológica. Para ello se llevaron a cabo observaciones microscópicas, se describieron los caracteres culturales y se determinó la respuesta a pruebas bioquímicas acorde con los protocolos descritos en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg y Holt, 1984,1986). La identificación de las cepas se realizó hasta género en los casos en que fue posible.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se comprobó la presencia de comunidades bacterianas en el suelo de la plantación muestreada en el orden de 10^6 ufc/g de suelo. Los valores de ufc/g de suelo de la plantación de bambú se mantuvieron en un orden similar al encontrado en *C. peltata* y en suelo sin cultivo (Tabla 1). Además, se observó crecimiento de colonias bacterianas en el medio de cultivo selectivo para fijadores de nitrógeno y solubilizadores de fósforo (Figura 2).

La diversidad microbiana, tradicionalmente, se ha determinado mediante el empleo de medios de cultivo selectivos y el conteo directo de viables. Existen otros métodos para estudiar la diversidad microbiana en el suelo que se basan en técnicas bioquímicas y moleculares. Se destacan: el análisis de los patrones de utilización de fuentes carbonadas (Ej. Biolog), el análisis de los ácidos grasos (FAME, por sus siglas en inglés: *Fatty acid methyl ester analysis*).

Tabla 1. Cuantificación de bacterias en medio de cultivo selectivo para fijadores de nitrógeno en plantación de *B. vulgaris* var. *vulgaris* de 4 años de cultivo, ubicada en la localidad «El Sijú» (Finca Forestal Integral) (Jibacoa, Manicaragua, Villa Clara) en dos medios de cultivo. Suelo sin vegetación y *C. peltata* se tomaron como referencia.

Tratamiento (muestras de suelo)	ufc g suelo ⁻¹
<i>B. vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i>	1.4×10^6
<i>Cecropia peltata</i>	7.1×10^6
Suelo sin vegetación	9.5×10^5

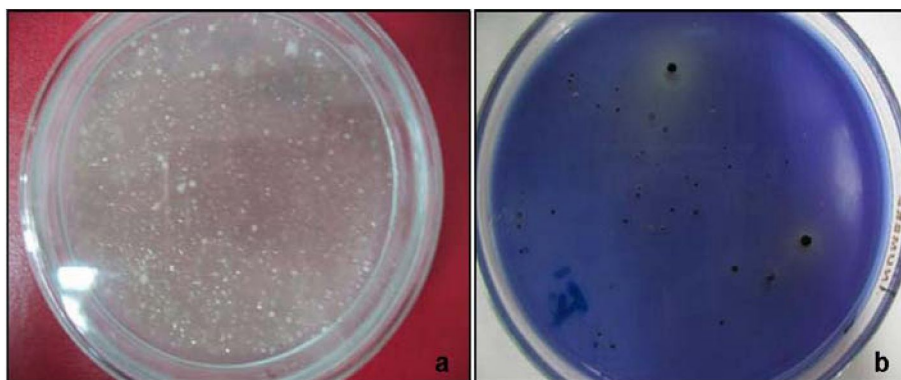


Figura 2. Colonias bacterianas crecidas en medios de cultivo selectivos: a) fijadores de nitrógeno (Medio de cultivo de Winogradsky), b) solubilizadores de fosfatos.

(Kirk *et al.*, 2004) así como técnicas basadas en electroforesis de ácidos nucleicos (DGGE y TGDE por sus siglas en inglés, *Denaturing gradient gel electrophoresis* y *Temperature gradient gel electrophoresis*, respectivamente) (Muyzer y Smalla, 1998). Sin embargo, el método de conteo en placas es rápido y puede proveer información sobre los componentes activos de las poblaciones (Tabacchioni *et al.*, 2000). Permite la dispersión de una muestra en un diluyente apropiado, distribuir una alícuota en un medio de cultivo de crecimiento, incubarla bajo condiciones óptimas y contar las colonias desarrolladas (Germida, 1993).

Los resultados mostrados tienen gran importancia ya que confirman la presencia de un elevado número de bacterias asociadas a las plantaciones de bambú que indudablemente contribuyen al desarrollo del cultivo. Especialmente, la presencia de fijadores de nitrógeno pudiera explicar las características de crecimiento de esta especie que no tiene grandes exigencias de fertilización y se adapta a suelos pobres en nutrientes.

Los datos analizados no son concluyentes, se requiere aumentar el número de muestras analizadas ya que las bacterias no se distribuyen de manera uniforme en el suelo y su concentración está influenciada por diversos factores. Sin embargo, se pudo observar que no existieron diferencias en cuanto al punto de muestreo (cercano al plantón (30cm) y a 3m de este). Esto puede estar condicionado por el tipo de sistema de radical del bambú y por ende la presencia de abundantes raíces aún a esta

distancia del centro del plantón y a esa profundidad.

Se identificaron siete cepas como *Bacillus*. La presencia de bacterias pertenecientes a la familia *Bacillaceae* en estos ecosistemas es frecuente (Aslin *et al.*, 2002). Esto se debe, en parte, a la presencia de características especiales como la formación de endosporas y la producción de sustancias con actividad antifúngica que les permiten la subsistencia y competencia en condiciones ambientales desfavorables. Según Setlow (2006), la formación de una spora genera un tipo de células que pueden sobrevivir durante largos períodos de tiempo con poco o nada de nutrientes y le confieren resistencia a la radiación, el calor y productos químicos. Varios autores han señalado las ventajas que tienen especies de esta familia debido a la presencia de esporas resistentes a pH, temperatura y condiciones osmóticas extremas (Basha y Kandasamy, 2007). Para la identificación del resto de las cepas se requieren un número mayor de pruebas.

El 100% de las cepas hidrolizó el almidón, el 100% la caseína y el 30% la gelatina. Además, el 20% produjo indol. Estas características evidencian que poseen capacidades metabólicas diversas.

Como resultado de este trabajo se cuenta con una colección de 80 cepas bacterianas de las cuales 23 se aislaron de medios selectivos para fijadores de nitrógeno y 10 de solubilizadores de fósforo (Figura 3).



Figura 3. Bacterias aisladas de suelo de plantaciones de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris*.

CONCLUSIONES

Se comprobó la presencia de comunidades bacterianas en el suelo de la plantación muestreada en el orden de 10^6 ufc/g de suelo y se observó crecimiento de colonias bacterianas en el medio de cultivo selectivo para fijadores de nitrógeno y solubilizadores de fósforo. Se identificaron siete cepas como *Bacillus*. Estas evidencias constituyen un punto de partida para estudios más profundos sobre las comunidades de bacterias asociadas a plantaciones de bambú.

Este trabajo fue presentado en el marco de la Primera Conferencia Regional de Bambú: El bambú en el desarrollo local, organizada por la Facultad de Construcciones, el Centro de Investigación y Desarrollo de Estructuras y Materiales (CIDEM) de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, la Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación (COSUDE), INBAR y la red ECOSur, del 17-19 de mayo de 2011. Villa Clara, Cuba.

REFERENCIAS

- Aslin, B, Saglam N, Beyatli Y (2002) Determination of Some Properties of *Bacillus* Isolated from Soil. Turk J Biol.26: 41-48
- Basha, S, Kandasamy U (2002) Antagonismo of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. Current Science 82(12):1457-1463
- Beattie, G (2007) Plant-associated bacteria: Survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. En: Gnanamanickan, SS (Ed.). Plant-Associated bacteria, pp. 1-56. Springer. Dordrecht
- Bowen, GD, AD Rovira (1999) The Rhizosphere and its management to improve plant growth. Adv. Agron. 66: 1-102
- Ehrlich HL (1990) Geomicrobiology, 2nd edn. Dekker, New York
- Germida J J (1993) Culltural methods for soil microorganisms. En: M R Carter (ed.) Soil sampling and methods of analysis. Canadian Society of Soil Science, pp. 263-275. Lewis Publishers. Ontario
- Giri, B, Giang PH, Kumari R, Prasad R, Varma A (2005) Microbial diversity in soils. En: Buscot F, Varma S, (eds). Microorganisms in soils: roles in genesis and functions, pp. 195–212. Springer-Verlag. Heidelberg
- Kirk, J, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomos JN, Lee H, Trevors JT (2004) Methods of studying soil microbial diversity. Journal of Microbiological Methods 58: 169-188
- Krieg, NR, Holt JG (1984) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 9th Edition. Vol. I. Williams and Wilkins, New York
- Krieg, NR, Holt JG (1986) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 9th Edition. Vol. II. Williams and Wilkins. Baltimore
- Li L, Liu M, Yang S, Liu L, Miao K, Yang K, Han J (2008) Cultivable microbial diversity at the rhizosphere of *Phyllostachys pubescens*. Acta Microbiol Sin 48:772–779
- Mehta, S, Nautiyal C (2001) An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. Current microbiology 43(1):51-56
- Setlow, P (2006) Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. Journal of Applied Microbiology 101 (3):514–525
- Torsvik, V, Ovreas L (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. Curr. Opin. Microbiol. 5: 240-245
- Zaidi, S, Usmani S, Singh BR, Musarrat J (2008) Significance of *Bacillus subtilis* strains SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. Chemosphere 64:991–997
- Zhuang XL, Chen J, Shim H, Bai Z (2007) New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. Environ Int. 33: 406–413