



# ECOLOGÍA DE COMUNIDADES MICROBIANAS AUTÓCTONAS DE SUELOS DE SERPENTINA DE MOA, HOLGUÍN, CUBA.

Ramón Batista García<sup>1</sup>

Juan Tacoronte<sup>2</sup>; Ayixon Sánchez Reyes<sup>1</sup>; Silvia Acosta Díaz<sup>1</sup>; Regla María Lurreiro<sup>1</sup>; Ana Luisa Martínez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones del Petróleo, Washinton 169, Esq. a Churrucá, Cerro, Ciudad de La Habana. E mail: batista@ceinpet.cupet.cu

<sup>2</sup>Centro de Ingeniería e Investigaciones Químicas, Vía Blanca entre Palatino e Infanta, Cerro, Ciudad de La Habana.

## INTRODUÇÃO

### Introducción

Los suelos ultramáficos o de serpentina son considerados ecosistemas naturales ricos en metales pesados (Chiarucci y Baker, 2007). Las rocas ultramáficas están constituidas por un amplio espectro de minerales, son comunes la piroxenita, dunita, serpentinita y peridotita (Sánchez - Mata *et al.*, 2002). Los suelos que evolucionan sobre este tipo de rocas se caracterizan por ser ligeramente ácidos, presentar bajo contenido de nutrientes (K, N, P), elevados coeficientes de erosión, altas concentraciones de metales pesados (Fe, Co, Cr, Hg, Ni) y bajo coeficiente Ca/Mg. Esta relación explica la poca productividad vegetal de estos suelos (Brady *et al.*, 2005; Garnier *et al.*, 2006; Maleri *et al.*, 2007). Estudios realizados en suelos de serpentina muestran que el contenido de metales pesados depende del material parental sobre el cual evolucionaron los procesos edáficos. Las concentraciones de Ni se han estimado entre 5 y 500 mg Kg<sup>-1</sup> y las de Cr se calculan entre 1 000 y 3 000 mg Kg<sup>-1</sup> (Hernández *et al.*, 2000).

Las formaciones ultramáficas están distribuidas en todo el mundo y sus edades geológicas difieren notablemente. Las más importantes se localizan en África Central y Oriental, Brasil, Cuba, Filipinas, India, Indonesia, Japón, México, Nueva Caledonia y Turquía (Reeves *et al.*, 1999), Estados Unidos (Kruckerberg, 2002), República Dominicana (Peguero, 2003), así como en Australia e Italia (Batianoff y Sings, 2001; Vercesi, 2003). Las formaciones de serpentina de Cuba y Nueva Caledonia se reconocen como los sistemas edáficos con mayores niveles de endemismo vegetal, constituyendo los ecosistemas ultramáficos más importantes del mundo (Iturralde, 2001; Brady *et al.*, 2005).

Las formaciones cubanas de serpentina ocupan aproximadamente el 7% de la superficie del país. Se reconocen 12 áreas ultramáficas en Cuba con diferencias en las edades geológicas, niveles de endemismo vegetal y cantidad de plantas hiperacumuladoras de Ni (Berzain *et al.*, 2007).

En Cuba la caracterización microbiológica de los suelos de serpentina es escasa. Pocos aislamientos microbianos se han

realizado de áreas de serpentina, y menos aun de la rizosfera de plantas hiperacumuladoras de metales. La ecología microbiana de los suelos de serpentina no ha sido muy estudiada en la región. Los ecosistemas de serpentina imponen a la microbiota que en ellos habita condiciones de vida diferentes a las clasificadas como normales por el hombre en cuanto a las concentraciones de metales pesados y cantidades de nutrientes esenciales que en ellos se depositan. Los microorganismos con hábitat en estos ecosistemas presentan mecanismos genéticos que garantizan su supervivencia y desarrollo (Mengani *et al.*, 2001). Muchos son los investigadores que plantean que los ecosistemas con condiciones físico - químicas estresantes para los microorganismos (como los suelos de serpentina) potencian sus capacidades fisiológicas, las cuales pueden ser utilizadas en beneficio del hombre (Deming, 2002; Hutchirus *et al.*, 2004). En condiciones de estrés ambiental los microorganismos pueden producir metabolitos con principios biológicos de gran interés, entre estos se encuentran las enzimas extracelulares (Féller *et al.*, 1996). La búsqueda de metabolitos producidos por los microorganismos que habitan en los suelos de serpentina pudiera ser una herramienta a explotar en beneficio del hombre. Los suelos de serpentina albergan una microbiota que pudiera ser potencialmente productora de enzimas y otros metabolitos de interés para la industria contemporánea.

## OBJETIVOS

### Objetivo

Caracterizar la microbiota autóctona no simbiótica de suelos no rizosféricos de la región ultramáfica de Moa, Holguín, Cuba.

## MATERIAL E MÉTODOS

Materiales y métodos

Toma de muestra: En el mes de diciembre de 2008 (estación de seca) se tomaron muestras de suelos de serpentina no rizoféricos, a 15 cm de profundidad con empleo de espátulas estériles y se envasaron en bolsas plásticas estériles. Se trasladaron en neveras a 4°C al Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones del Petróleo. Posteriormente se procedió al aislamiento primario de los representantes microbianos no simbióticos. Los aislamientos fueron codificados con la letra E y un número en correspondencia con el número consecutivo asignado a cada muestra (E01, E02 y E03).

Caracterización química de las muestras: Se realizó la caracterización de las muestras atendiendo a contenido de níquel, vanadio, hierro total, calcio, sulfatos, materia orgánica, pH, nitrógeno y fósforo.

Aislamiento microbiano: Se pesaron 5 g de cada muestra bajo condiciones de asepsia, se adicionaron a 45 mL de solución salina estéril (0.85%) y se homogenizaron en zaranda giratoria. A partir de esta mezcla se realizaron diluciones seriadas desde 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-4</sup> y se procedió con el aislamiento primario de los representantes microbianos no simbióticos. Para las bacterias se sembraron por el método de agotamiento con espátula de Drigalsky 100 µL de las diluciones 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-4</sup>, sobre medio Agar Triptona Soya. Para el aislamiento fúngico se empleo medio Extracto de Malta. Cada dilución fue inoculada por triplicado. Todas las placas inoculadas se incubaron a temperatura de 30 °C durante 72 horas.

Se seleccionaron las colonias más representativas atendiendo al número y frecuencia de aparición y se procedió con el aislamiento secundario en el mismo medio de cultivo de donde se aislaron. Se chequeó la pureza de cada cultivo con empleo de la Tinción de Gram (Harrigan y Mc Cance, 1968).

Los aislamientos bacterianos se conservaron a 4 °C en tubos de cultivos conteniendo medio Triptona Soya agarizado y por el método de congelación, para lo cual se utilizó como crioprotector glicerol al 20%.

Ubicación taxonómica de los aislados y caracterización: La ubicación taxonómica de los aislamientos se realizó atendiendo a:

- Las características tintoriales, culturales, morfológicas, agrupamiento de las células, presencia o no de endosporas, cápsula y cistos (Harrigan y Mc Cance, 1968).
- Las características fisiológicas y bioquímicas.

Para la determinación de estas características se inocularon los aislamientos en medios sólidos, selectivos y diferenciales para su ubicación taxonómica. Para esto se consideraron los géneros microbianos no simbióticos que colonizan con mayor frecuencia los suelos y se utilizaron los medios de cultivo: Extracto de Levadura Manitol; Agar Papa; Rojo Congo; Ashby y NFb semisólido (fijación biológica de nitrógeno); King A (pigmentos fluorescentes) y King B (pigmento de piocianina); Kligler (fermentación de glucosa, lactosa, producción de sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) y producción de gas) y Citrato. También se realizaron las pruebas de oxidasa y catalasa. Además se evaluó el crecimiento de las cepas en presencia de hidrocarburos.

## RESULTADOS

### Resultados y discusión:

Caracterización química de las muestras: Las muestras presentaron tener altas concentraciones de hierro y níquel en el orden este último de (3 122, 10 322 y 12 489 ppm) y solamente la muestra E02 contenía vanadio (4 503 ppm). Los contenidos de materia orgánica fueron inferiores a 0.08 mg Kg<sup>-1</sup> de suelo, los valores de nitrógeno inferiores al 0.63% y el fósforo inferior al 2.88 mg Kg<sup>-1</sup> de suelo. Las muestras manifestaron ligera acidez (pH aproximadamente de 6.0). Nuestros resultados de caracterización química concuerdan con los informados para otras muestras de serpentina estudiadas por otros investigadores (Hernández *et al.*, 2000; Brady *et al.*, 2005; Garnier *et al.*, 2006; Maleri *et al.*, 2007).

Aislamiento microbiano: De las muestras estudiadas se aislaron 15 bacterias no filamentosas y cuatro hongos. Predominaron en el aislamiento primario las bacterias y las cantidades de células que se recobraron de las muestras fueron de 3 x 10<sup>3</sup> UFC g<sup>-1</sup> de suelo en todas las muestras. Los hongos se obtuvieron en cantidades de 40, 50 y 30 colonias por gramo de suelo para las muestras E01, E02 y E03 respectivamente. El número total de microorganismos para las muestras E01, E02 y E03 fue de 3.4 x 10<sup>3</sup>, 3.5 x 10<sup>3</sup> y 3.3 x 10<sup>3</sup> respectivamente. El predominio de las poblaciones procariontes se corresponde con los estudios de suelos de serpentina realizados por otros investigadores. Por ejemplo, Pal *et al.*, (2005) mostraron un predominio de las poblaciones bacterianas sobre las fúngicas en suelos de serpentina de Andaman (India). Igual distribución obtuvo Adouddar *et al.* (2007) al aislar de suelos de serpentina 123 microorganismos, el 80.49% fueron bacterias y el 19.51% hongos filamentosos.

Caracterización de los aislados: Predominó en las bacterias la morfología bacilar y los bacilos Gram positivos, 53% de los aislados obtenidos. Se ubicaron aislados en los géneros *Brevundimonas vesicularis* (13%), *Bacillus* spp. (33%), *Aeromonas* spp. (13%), *Pseudomonas diminuta* (7%), *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (7%), *Sporolactobacillus* spp. (20%) y *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* (7%). Nuestros resultados coinciden con Mengani *et al.*, (2004) que informaron el predominio de bacterias Gram positivas en muestras de suelos de serpentina. Sin embargo, no coinciden con otros reportes de aislamientos microbianos de serpentina como (Pazos, 2000; Pérez *et al.*, 2002; Osti *et al.*, 2004; Ryan *et al.*, 2007; Zhuang *et al.*, 2007).

Predominaron las bacterias que no fermentan glucosa, lactosa, no producen gas, ni crecen sobre citrato como única fuente de carbono. Ninguna cepa produjo pigmentos difusibles en agua cuando fue cultivada en medio King A y King B.

Todas las bacterias estudiadas crecieron en presencia de aceites básicos, demostrándose su capacidad de crecer en medio de cultivo suplementado con hidrocarburos. Este hecho demuestra la potencialidad de las bacterias que habitan suelos de serpentina para obtener enzimas de interés en procesos de biorremediación de hidrocarburos.

## CONCLUSÃO

### Conclusiones

1. Los suelos de serpentina estudiados presentan baja densidad y diversidad microbianas debido a sus características físicas y químicas.
2. El 100% de las cepas aisladas presentan potencialidades para degradar fracciones aceitosas hidrocarburos.
3. Los suelos de serpentina constituyen ecosistemas naturales atractivos para el estudio ecológico de poblaciones microbianas bajo condiciones de estrés.

## REFERÊNCIAS

- Adoudrar W., Schwartz C., Benizr E., Morel J., Boularbah A. (2007) Soil microbial diversity as affected by the rhizosphere of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* under natural conditions. *International Journal of Phytoremediation*, 9: 41 - 52.
- Batianoff G., Singh S. (2001) Central ouensland serpentine landforms, plant ecology and endemism. *S. Afr. J. Sci.* , 97: 495 - 500.
- Berazaín R., de la Fuente V., Sánchez - Mata D., Rulfo L., Rodríguez N., Amils R. (2007) Níquel localization on tissues of hyperaccumulator species of *Phyllanthus* L. (Euphorbiaceae) from ultramafic areas of Cuba. *Biol. Trace Elem. Res.* , 115: 67 - 86.
- Brady K., Kruckeberg A., Bradshaw H. (2005) Evolutionary ecology of plant adaptation to serpentine soils. *Rev. Ecol. Evol. Syst.* , 36: 243 - 266.
- Chiarucci A., Baker A. (2007) Advances in the ecology of serpentine soils. *Plant Soil*, 293: 1 - 2.
- Féller G., Narinx E., Arpingny A., Haleb M., Baise E., Genicot S., Gerday Ch. (1996) Enzymes from psychrophilic organism. *FEMS Microbiol. Rev.* , 18: 189 - 202.
- Garnier J., Quantin C., Martins E., Becquer J. (2006) Solid speciation and availability of chromium in ultramafic soils from Niquelandia, Brazil. *Journal Geochem. Explor.* , 88: 206 - 209.
- Harrigan W., Mc Cance T. (1968) Métodos de laboratorio de Microbiología. Editorial Academia, España.
- Hernández G., Solorio G., Vasallo L., Flores L., Maples M., Hernández D., Alcalá R. (2000) Dispersión de Ni y Cr en sedimentos y suelos superficiales derivados de piroxenitas serpentinitas y basaltos de las cuevas de San Juan de Otales, estado Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 171: 125 - 136.
- Hutchius L., Hunter L., Ehya N., Gibbs M., Bergquist P., Hutton C. (2004) *Tetrahedron Asymm*, 15: 2975.
- Iturralde R. (2001) The influence of ultramafic soils on plants in Cuba. *S. Afr. J. Sci.* , 97: 510 - 512.
- Kruckeberg A. (2002) The influences of lithology on plant life. In: *Geology and plant life. The effects of landforms and rock type on plant.* Seattle/London: Univ. Wash. Press, 362.
- Maleri R., Reinecke S., Mesjasz - Przbylowics J., Reinecke A. (2007) Growth and reproduction of Earthworms in ultramafic soils. *Arab. Environ. Contam. Toxicol.*
- Mengani A., Barzanti R., Gonnelli C., Gabbrielli R., Bazzicalupo M. (2001) Characterization of nickel-resistance bacteria isolated from serpentine soil. *Environmental Microbiology*, 3: 691 - 708.
- Mengani A., Grassi E., Barzanti R., Brondi E., Gonnelli C., Kim C., Bazzicalupo M. (2004) Genetic diversity of bacterial communities of serpentine soil and of rhizosphere of the nickel-hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. *Microbial Ecology*, 48: 209 - 217.
- Osti C., Reyes L., Victoria E. (2004) Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: una revisión. *Tena Latinoamericana*: 225 - 239.
- Pal A., Dutta S., Mukherjee P., Paul A. (2005) Occurrence of heavy metal-resistance in microflora from serpentine soil of Andaman. *Journal Basic of Microbiology*, 45: 207 - 218.
- Pazos P. (2002) Aislamiento e identificación de cepas nativas pertenecientes al género *Azospirillum* mediante técnicas moleculares. *Tesis de Maestría. Facultad de Biología. Universidad de La Habana.*
- Peguero B. (2003) Inventario preliminar de la flora vascular exclusiva de suelos serpentinícolas en República Dominicana. *IV Conferencia Internacional sobre Ecología de Serpentina, Jardín Botánico Nacional de Cuba.*
- Pérez J., García G., Esparz F. (2002) Papel ecológico de la flora rizosférica en fitorremediación. *Avances y Perspectivas*, 21: 297 - 300.
- Reeves R., Baker J., Borhidi A., Berazaín R. (1999) Nickel hyperaccumulation in the serpentine flora of Cuba. *Annals of Botany* 83: 29 - 38.
- Ryan R., Germaine K., Franks A., Ryan D., Dawling D. (2007) Bacterial endophytes: a recent developments and applications. *FEMS Microbiology Lett.*
- Sánchez - Mata D., Vicenta G., Rodríguez - Rojo M. (2002) Estudios sobre fuentes hiperacumuladoras de níquel en la flora serpentinícola de California. *Sahironia* 1: 31 - 34.
- Vercesi G. (2003) Plant ecology of ultramafic outcrops [Northern Apennines (Piacenza), Region: Emilia Romagna]. *Proc. Int. Conf. Serpentine Ecol.*, 4 th., Havana 83, 34.
- Zhuang X., Chen J., Shim H., Bai Z. (2007) New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environmental International*, 33: 406 - 413.