

ESTUDIO DE BACTERIAS ASOCIADAS A ORQUÍDEAS (ORCHIDACEAE)

EMILIA RAMOS ZAMBRANO¹, TERESITA JIMÉNEZ SALGADO^{2,3} & ARMANDO TAPIA HERNÁNDEZ²

¹Escuela de Biología. Universidad Autónoma de Puebla, México

²Universidad Autónoma de Puebla, Laboratorio de Microbiología del suelo CICM. Edificio 76 Complejo de Ciencias. 3er. Piso ciudad universitaria C. P. 72510. Puebla, México

³Autor para correspondencia: terjimen@siu.buap.mx

México cuenta con 1 106 especies y subespecies de orquídeas distribuidas en 159 géneros, de las cuales 444 especies y subespecies son endémicas representando el 40% de los taxos registrados en el país. Esta diversidad constituye un enorme potencial ornamental, que hasta la fecha no se ha aprovechado en toda su magnitud por los mexicanos, especialmente por sectores de la sociedad que cuentan con estos recursos fitogenéticos (Red de ornamentales 2004, Soto 1996)

Las orquídeas representan la cúspide de procesos evolutivos y ecológicos dentro del reino de las plantas, ya que han desarrollado un amplio potencial evolutivo para su adaptación que si bien les ha permitido aprovechar un recurso y ocupar ciertos nichos, también las hace ser muy vulnerables ante los cambios en su ambiente, de la cual son objeto a través de la colecta indiscriminada; destrucción, modificación y fragmentación de su hábitat, estas características provocan bajas tasas de crecimiento, ciclos de vida relativamente largos y escaso reclutamiento de nuevos individuos en condiciones naturales así como el establecimiento de asociaciones con polinizadores, micorrizas y con otros organismos que son a veces tan específicas y complejas. (IUCN/SSC 1996; Ospina 1996).

Dentro de estas asociaciones poco conocidas, pero no por eso menos importantes son las que han establecido las orquídeas con bacterias, estas se han encontrado dentro del sustrato donde se desarrollan y en las raíces de orquídeas tanto epífitas como terrestres. De los géneros bacterianos aislados de estas orquídeas, se ha demostrado que *Azotobacter* y la bacteria *Bacillus radicolica* promueven la germinación de semillas de orquídeas por la producción de la fitohormona auxina (IAA). Y bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, y *Xanthomonas*) y *Sphingomonas* sp., *Microbacterium* sp., *Mycobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Rhizobium* sp., *Rhodococcus* sp., *Cellulomonas* sp., *Pseudomonas*

sp., y *Micrococcus luteus* también tienen la capacidad de producir esta hormona. (Knudson, 1922; Wilkinson *et al.* 1989 y 1994; Tsavkelova *et al.* 2004a, 2004 b).

Por otra parte se tiene conocimiento del empleo de biofertilizantes en plantas de importancia agrícola como maíz, trigo, caña de azúcar, arroz, café y tomate entre otros, donde se han observado cambios importantes al aplicarse estos, en el proceso de germinación, desarrollo y producción de los cultivos, los biofertilizantes son producidos por diferentes géneros bacterianos: *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Serratia*, estas respuestas se deben a que los microorganismos aumentan el reciclado y la solubilización de los nutrientes minerales y sintetizan vitaminas, aminoácidos, auxinas, giberelinas, citoquininas y etileno; así como algunas de ellas fijan nitrógeno reduciendo de manera importante el uso de fertilizantes químicos cuyo uso a largo plazo tienen efectos negativos para el ambiente (Frankenberger & Arshad 1995, Fuentes *et al.* 2003, Jiménez Salgado *et al.* 2004).

Aunque la composición de la microbiota asociada a orquídeas es de limitada especificidad, es importante realizar estudios sobre las poblaciones bacterianas que se encuentren asociadas a orquídeas en ambientes silvestres, ya que esta varía en función de las condiciones ambientales y del nicho ecológico en que se encuentren, además de las características morfológicas y fisiológicas que presentan las plantas y permitan el establecimiento de tales asociaciones. (Wilkinson *et al.* 1994).

En este trabajo se planteó estudiar la población de bacterias que se encuentran asociadas a dos especies de orquídeas *Laelia furfuracea*, especie endémica del estado de Oaxaca que crece en bosques de pino-encino, en clima frío seco y *Oncidium sphacelatum* especie tropical de amplia distribución.

TABLA 1. Géneros bacterianos aislados de plantas de *Laelia furfuracea*.

	Rizósfera	Rizoplano	Endófito Raíz	Endófito Hoja	Endófito Pseudobulbo	Total n=67
<i>Azospirillum</i>	4 (28.6%)	4 (28.6%)	3 (21.4%)	2 (14.3%)	1 (7.1%)	14 (20.9%)
<i>Enterobacter</i>	4 (22.2)	4 (22.2)	5 (27.8)	2 (11.1)	3 (16.79)	18 (26.9%)
<i>Pseudomonas</i>	3 (25%)	3 (25%)	3 (25%)	3 (25%)	3 (25%)	12 (17.9%)
<i>Acetobacter</i>	2 (16.7%)	3 (25%)	3 (25%)	1 (8.3%)	3 (25%)	12 (17.9%)
<i>Herbaspirillum</i>	3 (27.3%)	2 (18.2%)	3 (27.3%)	2 (18.2%)	1 (9.1%)	11 (16.4%)

TABLA 2. Géneros bacterianos aislados de plantas de *Oncidium sphacelatum*.

	Rizósfera	Rizoplano	Endófito Raíz	Endófito Hoja	Endófito Pseudobulbo	Total n=81
<i>Azospirillum</i>	4 (20%)	4 (20%)	4 (20%)	4 (20%)	4 (20%)	20 (24.7%)
<i>Enterobacter</i>	3 (21.4)	4 (28.6%)	4 (28.6)	3 (21.4%)	ND	14 (17.3%)
<i>Pseudomonas</i>	2 (15.4%)	4(30.8%)	3 (23.1%)	3 (23.1%)	1 (7.7%)	13 (16%)
<i>Acetobacter</i>	4 (22.2%)	4 (22.2%)	4 (22.2%)	4 (22.2%)	2 (11.1%)	18 (22.2%)
<i>Herbaspirillum</i>	3 (18.8%)	5 (31.3%)	5 (31.3%)	3 (18.8%)	ND	16 (19.8%)

ND = No hubo aislamiento

Material y Métodos

La recolección de plantas de *Laelia furfuracea* se realizó en la parte noreste del estado Oaxaca en agosto del 2005 y de *Oncidium sphacelatum* en la sierra Nororiental del Estado de Puebla en marzo de 2006. Se recolectaron 4 plantas en cada uno de los sitios. El aislamiento de bacterias se hizo en las diferentes zonas anatómicas de las orquídeas: rizósfera, rizoplano y endófitos que corresponden a pseudobulbo (tallo), hoja y rizoma, lavados y desinfectados con una solución de Hipoclorito de Sodio al 1% / 5 minutos, se enjuagó con agua destilada estéril (4 veces) y se maceró. Se procedió a inocular los viales con 100 µl de cada dilución en los medios: Nfb, para aislar *Azospirillum*; HNfb, para aislar *Herbaspirillum*; Mconkey en caldo e Hino y Wilson, para *Klebsiella* y bacterias entéricas; P4, para *Pseudomonas*; y LGI para *Acetobacter* se incubaron a 30° C durante 24-72 horas, transcurrido el tiempo de incubación se procedió a revisar el crecimiento característico en cada uno de los medios. En esta primera etapa se determinó la población bacteriana existente en las plantas de las orquídeas. Los viales positivos fueron sembrados en los mismos medios y se tomó la lectura de estos, posteriormente se tomó una asada y se sembraron por estría cruzada en los diferentes medios selec-

tivos para cada uno de los géneros de bacterias: *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Acetobacter*.

Resultados

En las tablas 1, 2 y 3 se presentan las frecuencias y poblaciones de los géneros bacterianos aislados. En las muestras de orquídeas de *Laelia furfuracea* se encontraron 67 cepas bacterianas de 5 géneros bacterianos. El género bacteriano con mayor frecuencia de aislamiento fue *Enterobacter* encontrándose en el interior de la raíz, seguido por *Azospirillum* en rizósfera y rizoplano, *Pseudomonas* en rizoplano y *Acetobacter* fue menor en rizósfera e interior de la raíz, finalmente *Herbaspirillum* se encontró en un 16.4% siendo el menos frecuente y con mayor número de aislados en la zona de la rizósfera e interior de la raíz (tabla 1). En las plantas de *Oncidium Sphacelatum* se logró aislar un total de 81 cepas de bacterias, a diferencia de *Laelia furfuracea* el grupo con mayor frecuencia fue *Azospirillum* (24.7%), seguido de las *Acetobacter* (22.2%) presentó una frecuencia de aislamiento constante en las diferentes zonas a excepción de pseudobulbo; La mayor frecuencia de aislamiento de los géneros bacterianos correspondió a *Pseudomonas* con un (30.8%) en la

TABLA 3. Población de microorganismos en log(células/ gramo de peso fresco) aislados de las diferentes plantas de orquídeas de *Laelia furfuracea* (Oaxaca) y *Oncidium sphacelatum* (Puebla).

Zona de la planta	Lugar de muestreo	<i>Azospirillum</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Acetobacteres</i>	<i>Herbaspirillum</i>
Rizósfera	Oaxaca	4.18	7.04	6.3	6.15	7.15
	Puebla	6.04	6.04	5.88	5.15	5.15
Rizoplano	Oaxaca	7.15	7.15	6.3	6.15	7.15
	Puebla	7.15	7.15	7.15	7.15	7.15
Endófito Raíz	Oaxaca	5.15	7.15	6.15	6.15	5.18
	Puebla	7.15	7.15	7.15	7.15	7.15
Endófito Hoja	Oaxaca	2.65	2.65	4.04	4.04	4.65
	Puebla	5.7	5.18	5.06	4.78	4.18
Endófito Pseudobulbo	Oaxaca	ND	ND	2.65	2.65	3.18
	Puebla	ND	ND	2.65	2.65	3.18

ND = No hubo aislamiento

zona del rizoplano, se puede observar en la tabla 2 que la frecuencia en la zona de pseudobulbo fue baja y nula para algunos microorganismos como *Enterobacter* y *Herbaspirillum*.

En relación a las poblaciones (tabla 3) en *Laelia furfuracea*, las mayores poblaciones se encontraron en rizósfera y rizoplano, en cambio en *Oncidium sphacelatum* se encontraron en rizoplano e interior de la raíz. En *Laelia furfuracea* el género bacteriano con mayor población en rizósfera fue *Herbaspirillum* (7.15 log cel/gr de peso fresco) y en *Oncidium sphacelatum* fueron *Azospirillum* y *Acetobacter* (6.04 log cel/gr de peso fresco). En *Oncidium sp.* en rizoplano, las poblaciones fueron constantes y elevadas para los 5 géneros (7.15 log cel/gr de peso fresco) y en *Laelia sp.*, *Acetobacter* y *Pseudomonas* tuvieron una menor población (6.15 y 6.3 log cel/gr de peso fresco respectivamente).

En cuanto a microorganismos endófitos, se encontró que *Enterobacter* tuvo una mayor población en *Laelia sp.* en el interior de la raíz (7.15 log cel/gr) y en *Oncidium sp.* los 5 géneros presentaron las mismas poblaciones (7.15 log cel/gr). Al interior de la hoja las poblaciones disminuyeron en las dos especies de orquídeas, sin embargo en *Laelia sp.* el género más representativo fue *Herbaspirillum* (4.65 log cel/gr), y para *Oncidium sp.* fue *Azospirillum* (5.7 log cel/gr). En el interior de pseudobulbo las poblaciones de las bacterias disminuyen y no se detectan ni *Azospirillum* ni *Enterobacter*; *Acetobacter* y *Pseudomonas* presentan una población de 2.65 log cel/gr y *Herbaspirillum* presenta la mayor población dentro de los géneros

(3.18 log cel/gr), para ambas especies de orquídeas (tabla 3).

Los datos anteriores son de los primeros informes sobre la asociación de Enterobacterias, *Pseudomonas* y microorganismos fijadores de nitrógeno (*Azospirillum*, *Enterobacter* y *Herbaspirillum*) en este tipo de cultivos como los que se tienen sobre la asociación de cultivos de tipo perenne como el café con *Acetobacter diazotrophicus* (Jiménez y col., 19979 y *Azospirillum* (Jiménez, Salgado y col 2004)..En contraste existen numerosos reportes sobre la asociación benéfica de enterobacterias, azospirilla y pseudomonas con cultivos económicamente importantes y de ciclo corto como maíz, trigo, caña de azúcar y arroz entre otros (Okon y Labandera-González, 1994; Haahtela y col, 1988; Barraquio, 1983).

La rizósfera ha sido el lugar donde se han encontrado la mayoría de los microorganismos que han resultado benéficos para los cultivos (Sundaram y col., 1988), aunque también es ahí donde habitan bacterias que pueden ocasionar daño a la planta hospedera. Los microorganismos se encuentran localizados sobre la capa mucilaginoso de la superficie de la raíz y en los tejidos superficiales de la misma, de donde reciben carbono orgánico en forma de exudados, secreciones y tejidos muertos. La presencia de bacterias en las otras zonas anatómicas de las orquídeas indica que existe un mecanismo por el cual pueden llegar al interior, así como su capacidad para poder adaptarse a las nuevas condiciones imperantes a su alrededor. La situación actual de la bacteria y su abundancia dentro

de la raíz no se conoce perfectamente pero su capacidad de sobrevivir en el interior de las plantas con poca o ninguna competencia las hace candidatas potenciales para el control biológico (Misagui & Donndelinger 1990).

LITERATURA CITADA

- Barraquío W.L., J.K. Ladha & I. Watanabe. 1983. Isolation and identification of N₂-fixing *Pseudomonas* associated with wetland rice. *Can. J. Microbiol.* 29 : 867-873.
- Frankenberger W.T. & M. Arshad. 1995. Phytohormones in soils; microbial production and Function. Marcel Dekker, New York
- Fuentes R.L.E., H.A. Tapia, S.T. Jiménez, E.M.A. Mascarúa, P.Y. Santoyo, V.L.R. Caso, H.H.T. Romero, E.M. del R. Cajica, B.D. León, P.M. Rosales, M.P. Fügemann & R.M.G. Castillo. 2003. Bacterias acéticas: diversidad e interacción con las plantas, *Elementos* 49(10): 47.
- Hahtela K., T. Laakso, E.L. Nurmiaho & T. Korhonen. 1988. Effects of inoculation of *Poa pratensis* and *Triticum aestivum* with root-associated, N₂-fixing *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Azospirillum*. *Plant and Soil.* 106: 239-247.
- IUCN/SSC Orchid Specialist Group. 1996. Orchids – Status survey and conservation action plan. IUCN, Gland Switzerland and Cambridge, UK.
- Jiménez S.L., C.H. Vázquez & H.A. Tapia. 2001. Response of the coffee plant to the inoculation with *Azospirillum* sp. In: Nitrogen fixation: global perspectives. Proceedings of the 13th International Congress on nitrogen fixation. Hamilton, Ontario, Canada.
- Jiménez Salgado T., L.E. Fuentes-Ramírez, L.E., A. Tapia-Hernández, E.M.A. Mascarúa-Esparza, E. Martínez-Romero & J. Caballero Mellado. 1997. *Coffea arabica* L., new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of other nitrogen fixing acetobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(9): 3676-3683.
- Knudson, L., 1922. Nonsymbiotic Germination of Orchid Seeds, *Bot. Gaz.* 73(1): 1–25.
- Misaghi I.J. & C.R. Donndelinger. 1990. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology* 80: 808-811.
- Okon Y. & C.R. Labandera-González. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil. Biol. Biochem.* 26: 1591-1601.
- Ospina, H. M., 1996, *Orchidology and Biotechnology, Orchids:* 1072-1074.
- Red de ornamentales 2004. (<http://www.uaemex.mx/ornamentalesred/home.html>)
- Soto-Arenas, M. A. 1996. México (Regional account). Pp. 53-58 in: IUCN/SSC Orchid Specialist Group. Orchids. Status survey and conservation action plan, IUCN.
- Sundaram S., A. Araunakumari & R. Klucas. 1988. Characterization of *Azospirilla* isolated from seeds and roots of turf grass. *Can. J. Microbiol.* 34 : 212-217.
- Tsavkelova, E.A., T.A. Cherdynseva & A.I. Netrusov. 2004a. Bacteria associated with roots of epiphytic orchids. *Mikrobiologiya* 73(6): 825–831.
- Tsavkelova, E.A., T.A. Cherdynseva & A.I. Netrusov. 2004b. Auxin production by bacteria associated with orchid roots. *Microbiology* 74(1): 46–53, translated from *Mikrobiologiya* 74(1): 55–62.
- Wilkinson K. H., K.W. Dixon & K. Sivasithamparam. 1989. Interaction of soil bacteria, mycorrhizal fungi and orchid seed in relation to germination of Australian orchids. *New Phytol.*, 112: 429-435
- Wilkinson, K.G., K.W. Dixon, K. Sivasithamparam & E.L. Ghisalberti. 1994. Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria. *Plant Soil* 159: 291–295.

Emilia Ramos Zambrano es estudiante de la Escuela de Biología de la Benemérita Universidad Autónoma (BUAP) de México, y actualmente realiza un estudio de bacterias asociadas a orquídeas benéficas para su crecimiento en el laboratorio de Microbiología del suelo ICUAP. Se interesa en la reproducción de orquídeas para un aprovechamiento sustentable.

Teresita Jiménez Salgado es profesora investigadora en Microbiología del suelo en el Instituto de Ciencias de la BUAP. Sus intereses son la biofertilización en cultivos de interés agrícola y la biotecnología agrícola. Ha realizado estudios de la diversidad de microorganismos asociados al cultivo del café y orquídeas en México.

Armando Tapia Hernández es profesor investigador en Microbiología del suelo en el Instituto de Ciencias (ICBUAP). Sus principales líneas de investigación son la biofertilización (donde ha realizado estudios de microorganismos asociados a orquídeas) y la biotecnología agrícola, con énfasis en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.