

CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA DESCOMPOSICIÓN DE HOJAS CONSUMIDAS POR *Tremarctos ornatus* (URCIDAE) Y POSIBLE RELACIÓN EN SU DATACIÓN

Characterization of Microorganisms Associated to Leave Decomposing Consumed by *Tremarctos ornatus* (Urcidae) and Its Possible Data Relation

YUSLENI FIERRO TOSCANO¹, EDUARDO RUDAS BURGOS¹,
CATALINA LARA^{1,2}, MARÍA ALEJANDRA PINZÓN¹,
JIMENA SÁNCHEZ^{1,3}, M.Sc.

¹Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá, ciudad universitaria, Carrera 30 No. 45-03.

²aclarar@unal.edu.co, ³jsanchezn@unal.edu.co

Presentado el 1 de septiembre de 2005, aceptado el 3 de abril de 2006, correcciones el 14 de agosto de 2007.

RESUMEN

Se establecieron bases para un método de datación de hojas consumidas por *Tremarctos ornatus*, con base a la presencia de microorganismos aislados de restos vegetales de las hojas de *Tillandsia* spp. recogidos en campo, correspondientes a diferentes etapas de descomposición. Las muestras (2 cm de la base de la hoja consumida por el animal) fueron procesadas en el laboratorio para el aislamiento y caracterización de los microorganismos presentes, encontrando que los morfotipos bacterianos predominantes fueron cocobacilos (*Pseudomonas* sp.) y bacilos Gram negativos, (los primeros se encontraron en todas las edades de descomposición y los segundos solo en las muestras menores a seis meses). Morfotipos correspondientes a cocobacilos Gram positivos solo se encontraron en hojas entre 1-3 meses y bacilos Gram positivos (*Bacillus* sp.) en hojas de menos de un mes. Cocos y diplococos Gram positivos solo se presentaron en la muestra de hoja con 5-6 meses de descomposición. Se encontraron cuatro morfotipos de hongos, dos corresponden a *Mucor* sp. y *Trichoderma* sp., además de *Epicoccum* sp., *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp. El género *Trichoderma* sp. se encontró asociado a por lo menos uno de los morfotipos anteriormente mencionados en rastros mayores de un mes e inferiores a cinco meses.

Palabras clave: descomposición, microorganismos, datación, *Tremarctos ornatus*.

ABSTRACT

We established basis for a date-telling method of leaves (*Tillandsia* spp.) consumed by *Tremarctos ornatus* by determining or detecting the presence of microorganisms. We used samples from the field that corresponded to different states of decomposition. The samples (2 cm from the leaf base consumed by the animal) were processed in the labo-

ratory, characterized and determined. Cocobacilli (*Pseudomonas* sp.) and negative bacilli Gram were the most common bacteria morphotypes, the first were founded on samples from all ages and the second on samples no older than six months. Positive cocobacilli Gram (*Bacillus* sp.); were just present in samples between one and three months old. Positive Gram bacilli occurred only in samples no older than a month, cocos and diplococos in samples between five and six months. Four fungus morphotypes were found, two of them being *Mucor* sp., and *Trichoderma* sp., in addition to *Epicoccum* sp., *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp. *Trichoderma* was associated with at least one more kind of fungus, for samples to older than one month, but no older than five months.

Key words: decomposition, microorganisms, dating, *Tremarctos ornatus*.

INTRODUCCIÓN

El proyecto surgió como complemento a un programa llevado a cabo por la Corporación Manaba en el parque natural nacional (PNN) El Cocuy, para la rehabilitación y reintroducción de dos oseznos (*Tremarctos ornatus*) de origen silvestre, durante el período 2003-2004. La primera fase del proceso se realizó en un encierro de cuarentena (previamente construido) empleando un tanque de floculación de agua potable de 10 m x 3 m x 4,5 m, propiedad de la Empresa de Acueducto y Alcantarillado de Bogotá (EAAB), cercano al barrio Rosales, "Quebrada La Vieja", Bogotá (Colombia). Uno de los ejemplares escapó en octubre de 2003 de los predios de la EAAB y el ejemplar que actualmente sigue cautivo, se encuentra en el Centro de Recepción de Fauna de Gargoa, en jurisdicción de Corpochivor, Boyacá, Colombia (Poveda, 2003). Estos osos consumen la parte basal de las hojas junto con el corno de quiche o bromelia (Castellanos, 1998). Antes de consumir la planta, el oso desgarrar las hojas externas, la arranca y la invierte sosteniéndola entre las manos y/o pies dependiendo del tamaño. Al morderla utilizan tan solo los incisivos, dejando marcas visibles en los restos y que son utilizadas para su seguimiento (Poveda, 2003). La edad aproximada de los rastros vegetales se determina por la coloración de las hojas y los olores que emanan, no obstante, a causa de la inexistencia actual de bibliografía relacionada con dicha característica, generalmente la datación de los rastros es poco exacta y debe ser realizada por personas con amplia experiencia en campo. Para el presente estudio, un experto en la biología de ésta especie (Poveda, 2003), determinó que un olor a alcohol y una tonalidad verde se encuentran asociados a rastros muy recientes, en tanto que los rastros mas viejos, carecen de olor y la coloración tiende a ser parda. El objetivo de la investigación fue establecer las bases para un método de datación de hojas consumidas en condiciones de campo por *Tremarctos ornatus*, mediante la detección de microorganismos cultivables presentes en restos vegetales de *Tillandsia* sp. con diferentes etapas de descomposición.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras se recolectaron en los Cerros Orientales de Bogotá tomando cinco muestras de plantas (*Tillandsia* spp.) en diferentes etapas de descomposición que pre-

sentaban marcas de herbivoría, correspondientes a cortes de cerca de 2 cm a partir del extremo mordido de la hoja. El material obtenido fue transportado bajo condiciones asépticas al laboratorio de Microbiología del Suelo del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, para su posterior análisis. El material fue lavado con hipoclorito de sodio 1% (1 minuto), alcohol 1% (1 minuto) y agua destilada, realizando posteriormente siembra directa en Agar Nutritivo (AN) y en Agar Papa Dextrosa (PDA; dos réplicas por muestra), incubando a temperatura ambiente. Se efectuó descripción macroscópica de las colonias, así como de las características microscópicas mediante tinción de Gram (bacterias) y preparaciones con azul de lactofenol (hongos). (Domsch y Gams, 1980; Valencia, 2004). Para caracterización de los géneros bacterianos se efectuaron pruebas bioquímicas de utilización de sustratos (Krieg y Holt, 1994).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al hacer la descripción microscópica de los aislamientos bacterianos obtenidos, se observó que la mayoría de morfotipos predominantes fueron cocobacilos Gram negativos, el morfotipo B6 (Tabla 1) fue el único correspondiente a cocobacilos Gram positivos. Otro tipo de morfotipo bacteriano que se presentó con frecuencia fueron bacilos Gram negativos. Solamente el morfotipo B5 correspondió a bacilos Gram positivos. Al efectuar el análisis microscópico se observó que los cocobacilos Gram negativos estuvieron presentes en todas las etapas de descomposición de la hoja de Bromelia, mientras que los cocobacilos Gram positivos solo se presentaron en hojas con descomposición mayor a un mes y menor a tres meses. Bacilos Gram positivos solo aparecieron en hojas con menos de un mes de descomposición. Los bacilos Gram negativos se presentaron en todas las edades de descomposición menores a seis meses. Los cocos y diplococos solo se presentaron en la muestra de hoja que tenía entre cinco y seis meses de descomposición. A partir de estos resultados se podría suponer que las etapas de descomposición están asociadas a determinados morfotipos bacterianos. Adicionalmente, es importante resaltar que ninguno de los morfotipos de bacterias identificados se encontró repetido en ninguna de las muestras (Tabla 1). En el caso de los hongos (H), a diferencia de las bacterias, hay dos morfotipos que se repiten en diferentes muestras. Este patrón se observó en el morfotipo H2 (*Trichoderma* sp.) que se presentó en las muestras 1, 2, 4, es decir, en hojas que comió el oso de más de un mes, pero inferior a cinco meses; este hongo se caracteriza por la reconocida producción de enzimas involucradas en la degradación de material vegetal como calobiohidrolasas, xilanasas, entre otras (Gamerith *et al.*, 1992). Otro hongo que mostró un patrón similar es el morfotipo H3 (*Mucor* sp.), presente en muestras mayores de un mes y menores de tres meses, volviendo a aparecer en muestras mayores a seis meses. Es posible que este hongo que es saprófito del suelo, vea favorecido su crecimiento en estas dos etapas de descomposición de acuerdo a características del sustrato y/o a condiciones ambientales, disminuyendo su crecimiento entre los tres y seis meses.

Etapa de descomposición de las hojas (meses)	Morfortipo		Descripción macro y microscópica
	Bacteria (B)	Hongo (H)	
<1	5		Consortio bacteriano: colonias mucoides, borde entero, cocobacilos Gram negativos (<i>Pseudomonas</i> sp.); colonias crema, bacilos Gram positivos con endospora (<i>Bacillus</i> sp.); bacilos Gram negativos (sin identificar).
		4	Colonia pardo rojiza con anverso blanquecino, con pigmentos difusibles, aterciopelada (<i>Epicoccum</i> sp.); colonia blanca algodonosa de hifas delgadas con zoosporangios (hongo zoosporico); hongo pardo-amarillento de colonia granular e hifas septadas (sin identificar).
	7		Colonias mucoides, borde entero, cocobacilos Gram negativos (<i>Pseudomonas</i> sp.).
<3		2	Colonia verde, algodonosa (<i>Trichoderma</i> sp.); hongo de hifas gruesas septadas y oscuras, micelio estéril (<i>Rhizoctonia</i> sp.).
		3	Colonia grisácea algodonosa, con presencia de esporangios (<i>Mucor</i> sp.).
	6		Consortio bacteriano: colonias mucoides, borde entero, cocobacilos Gram negativos (<i>Pseudomonas</i> sp.); bacilos Gram negativos (sin identificar).
3		2	Colonia verde, algodonosa (<i>Trichoderma</i> sp.); hongo de hifas delgadas que formar bucles (sin identificar).
>5		1	Colonia dematiácea, anverso negro-verdoso y reverso más oscuro, con zonación; textura aterciopelada, hifas café septadas con conidias terminales (<i>Cladosporium</i> sp.).
		2	Colonia verde algodonosa (<i>Trichoderma</i> sp.); hongo de hifas gruesas septadas y oscuras, micelio estéril (<i>Rhizoctonia</i> sp.).
	1		Colonia blanca, mucoide, puntiforme, plana, borde entero. Pleomórfica (diplococos, cocos y cocobacilos) Gram negativos (sin identificar).
	2		Consortio bacteriano: colonias mucoides, borde entero, cocobacilos Gram negativos (<i>Pseudomonas</i> sp.); colonias crema, bacilos Gram positivos endosporados (<i>Bacillus</i> sp.); bacilos Gram negativos (sin identificar).
6		3	<i>Mucor</i> sp.
	3		Colonias mucoides, borde entero, cocobacilos Gram negativos (<i>Pseudomonas</i> sp.).
	4		Colonias mucoides, borde entero, cocobacilos Gram negativos (<i>Pseudomonas</i> sp.).

Tabla.1. Descripción de los morfortipos de microorganismos presentes en muestras de hojas de diferente edad de *Tillandsia* spp., consumidas por el oso *Tremarctos ornatus*.

Por su parte, el morfortipo H1 (*Cladosporium* sp.) fue exclusivo de la muestra mayor a tres meses y menor a cinco meses, posiblemente por su actividad de degradación de materia orgánica (Rao *et al.*, 1998). El morfortipo H4 solo se presentó en hojas con menos de un mes de descomposición. Para poder dilucidar la razón de estos patrones temporales, se recomienda realizar posteriores estudios para analizar qué factores físico-químicos y ambientales influyen en cada etapa de descomposición. Para esto sería conveniente conocer los microorganismos presentes en las cavidades bucales y uñas de los animales, en las piscinas al interior de las rosetas de las bromelias, en los suelos de los bosques alto andinos y páramos, además de aquellos presentes en los ambientes circundantes a las muestras. Así mismo, se debe tener un mayor conocimiento de los patrones de conducta alimentaria de estos animales para identificar con mayor exactitud los rastros (no solo vegetales) para diferenciar entre una bromelia que ha caído de forma natural, con una que ha sido consumida por un oso. Adicionalmente, se recomienda

realizar líneas de tiempo de descomposición en condiciones de laboratorio, utilizando muestras consumidas y no consumidas, sometiéndolas a diferentes condiciones que simulen aquellas en campo. Del mismo modo se recomienda probar un medio de cultivo con extracto de quiche, obtenido del procesamiento de la parte basal de la hoja y realizar un procedimiento similar al utilizado en este proyecto, además de medios de cultivo para microorganismos celulolíticos y lignolíticos. Por todo lo anterior, el conocimiento de los anteriores patrones permitiría relacionar la presencia de ciertos microorganismos con la edad de las muestras otorgando una mayor exactitud.

AGRADECIMIENTOS

A la Corporación Manaba por facilitarnos la entrada a los terrenos de la EAAB además de la asesoría en el trabajo de campo y el facilitarnos información sobre la biología del animal. A Fidel Poveda por acompañarnos en el trabajo de campo y la asesoría en el seguimiento y reconocimiento de rastros, además del incentivarlos a socializar el trabajo. A Hernando Valencia del Departamento de Biología, por su guía y paciencia durante el desarrollo de este proyecto. A Claudia, encargada de los laboratorios de microbiología, por su enorme colaboración en los cultivos y pruebas bioquímicas para la identificación de los microorganismos. A los guardabosques de la EAAB quienes nos guiaron y amenizaron el trabajo de campo.

BIBLIOGRAFÍA

- CASTELLANOS PA. La rehabilitación y liberación de tres osos de anteojos en la reserva biológica de Maquipucuna, Ecuador; 1998.
- DOMSCH KH, GAMS W. Compendium of Soil Fungi. London-New York: Academic Press. Vol. 1 y 2; 1980.
- GAMERITH G, GROICHER R, ZEILINGER S, HERZOG P, KUBICEK P. Cellulase-Poor Xylanases Produced by *Trichoderma reesei* RUT C-30 on Hemicellulose Substrates. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 1987;2(1):9-13.
- KRIEG NR, HOLT JG. (Eds). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* 9 ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD; 1994.
- POVEDA F. Autoecología de oso andino *Tremarctos ornatus* en proceso de rehabilitación, contrato 2-02-24100-351-2003 EAAB-Corporación Manaba. 2003
- RAO MB, TANKSALE AM, GHATGE MS, DESHPANDE VV. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62(3):597-635.
- VALENCIA H. Manual de prácticas de microbiología básica. Notas de Clase. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Unilibros, Bogotá; 2004.

