

## ABUNDANCIA Y DIVERSIDAD DE LAS COMUNIDADES DE *Streptomyces* EN SEIS COBERTURAS VEGETALES DE LA FRANJA CAFETERA DEL QUINDÍO, COLOMBIA

### Abundance and diversity of *Streptomyces* communities on six land covertypes of the coffee belt in Quindío, Colombia

Pilar Corredor<sup>1</sup>, Eugenio Andrade<sup>1</sup>, Joseph Tohme<sup>2</sup>,

Myriam Duque<sup>3</sup> y Camilo Flórez<sup>3</sup>

(1) Universidad Nacional de Colombia,

(2) CIAT, Instituto Alexander von Humboldt

(3) División de Biotecnología

#### RESUMEN

Seis coberturas vegetales de la franja cafetera del Quindío, en Colombia, fueron seleccionadas para un estudio comparativo de la estructura comunitaria del género *Streptomyces*. Mediante un recuento en placa se estimó la abundancia y diversidad morfológica, y a partir de un análisis de PCR-RFLP del marcador rRNA 16S se estimó la diversidad genética entre los morfotipos. El mismo análisis genético se usó en muestras de DNA comunitario lo que facilita el estudio de la fracción complementaria no cultivable. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la abundancia de *Streptomyces* entre las seis coberturas vegetales. Se obtuvieron valores de diversidad morfológica similares en las seis coberturas, presentándose los valores más altos en guaduales y pasturas. No se encontró correspondencia entre la diversidad morfológica y genética, con excepción de lo observado en cafetales con guamo y plátano. En el análisis genético cultivo-independiente se observó un patrón específico para cada cobertura, siendo el valor más alto el de la cobertura bosque. Los resultados demuestran que la estructura de la comunidad de *Streptomyces* es dependiente de la cobertura vegetal, en cuanto a los parámetros de diversidad y abundancia estudiados.

**Palabras clave:** ecología de *Streptomyces*, PCR-RFLP, cultivo en placa.

#### ABSTRACT

Community structure of the *Streptomyces* genus was compare for six land cover types of the coffee belt in Quindío (Central Cordillera, Colombian Andes). A plate counting method was used to estimate abundance and morphotypic diversity. Genetic diversity was studied by PCR-RFLP of ribosomal 16S genes. Likewise, ribosomal restriction analysis was used to determine genetic diversity from soil sample DNA community, including the non-cultivable fraction of the community. The analysis showed significant statistical differences on the abundance of *Streptomyces* among the six cover types. Similar values of morphotypic diversity were obtained for the six cover types,

having “guadales” and pasture the highest values. It was found that genetic and morphological diversity were dissimilar, except for coffee shaded by banana and *Inga*. In the culture-independent analysis each cover type was characterized by specific RFLP pattern, the forest cover type presented the highest diversity. The results show that modifications in the cover type exert an influence on *Streptomyces* soil communities resulting in abundance and diversity variations.

**Key words:** *Streptomyces* ecology, PCR-RFLP, plate count.

## INTRODUCCIÓN

El género *Streptomyces* (Waksman y Henrici, 1947), es uno de los géneros más característicos y conocidos de la división *Actinobacteria*, la cual agrupa a bacterias filamentosas Gram-positivas, con un contenido de guanina más citocina (G+C) superior a 50% (Stackebrandt *et al*, 1997). Los Actinomycetos están ampliamente distribuidos en la mayoría de tipos de suelo en todas las zonas climáticas, y por sus propiedades bioquímicas y metabólicas, así como por su participación en la descomposición de tejidos animales y vegetales en el humus, son miembros importantes del sistema de descomposición del suelo (Szabo, 1974; Madigan, *et al*, 1998).

*Streptomyces* se caracteriza por poseer una morfología particular en donde se diferencian dos formas de crecimiento, una primaria o asimilatoria y una secundaria o reproductiva (Korn-Wendisch y Kutzner, 1991). El género es de gran importancia biotecnológica debido a que como metabolitos secundarios produce antibióticos que son de amplio uso en medicina humana y veterinaria (Cullum *et al*, 1988), así como compuestos represores de tumores, enzimas y vitaminas (Chun *et al*, 1997).

A pesar de la importancia de *Streptomyces* como uno de los elementos característicos de las poblaciones microbianas edáficas, se conoce poco acerca de su comportamiento en este ambiente, siendo reconocida la necesidad actual del estudio de la distribución del género en diferentes regiones climáticas y ecológicas (Xu *et al*, 1996). Se encuentran reportadas numerosas formas de detección e identificación de aislamientos de *Streptomyces*; la más reconocida y empleada es la técnica de cultivo de enriquecimiento (Morgan y Winstanley, 1997), en donde mediante la formulación de un medio de cultivo con los nutrientes apropiados y la utilización de condiciones de crecimiento adecuadas, es posible obtener aislamientos primarios de microorganismos particulares (Madigan, *et al*, 1998). Una metodología alternativa, independiente del aislamiento, se basa en la amplificación de los genes ribosomales y su análisis por secuenciación, patrones de restricción o electroforesis en geles con gradientes desnaturalizantes, para definir la diversidad genética de las comunidades bacterianas en el ambiente (Rosado *et al*, 1997; Head *et al*, 1998).

En este trabajo se exploran ambas técnicas de aproximación, cultivo dependiente y cultivo independiente, para comparar la abundancia y diversidad de las comunidades edáficas de *Streptomyces* en seis coberturas vegetales de la franja cafetera del Quindío. Se realizó una aproximación morfológica a la abundancia y diversidad del género mediante

cultivo en medio selectivo y una estimación de la diversidad genética a partir de un análisis de restricción de amplificados del DNA ribosomal o PCR-RFLP (Vallaey *et al*, 1997).

## MATERIALES Y METODOLOGÍA

### LOCALIZACIÓN Y MUESTREO

Este trabajo se llevó a cabo en nueve municipios del departamento del Quindío, ubicado en la vertiente occidental de la cordillera central colombiana. Todos los municipios son característicos de la franja cafetera del departamento, con alturas entre 1.294 y 1.772 m y una temperatura promedio de 19 a 21°C. La economía de los municipios se basa en la producción agrícola, destacándose el café como cultivo típico de la región. En general los suelos analizados son de textura franca, con un pH medianamente ácido (entre 5.08 y 5.60), un porcentaje de materia orgánica alto, un porcentaje de humedad entre 23 y 90% y un contenido de nitrógeno y fósforo dentro de los rangos reportados por Marin (1986), para la región.

Se analizaron 6 tipos de cobertura vegetal: bosque, gradual, cafetal con sombrío (sombrío con guamo y sombrío con guamo y plátano), cafetal sin sombrío y pasturas, considerando 4 repeticiones de cada uno de estos tratamientos. Para el análisis de placa de cultivo se tomaron 4 muestras compuestas en cada cobertura, producto de la reunión de tres muestras individuales tomadas sobre una línea de referencia. Para el análisis cultivo independiente y la caracterización físico-química del suelo, se tomó una muestra compuesta por cobertura. Las muestras individuales se colectaron con un cilindro de 5 por 5 cm, siempre a nivel superficial, conservándolas refrigeradas hasta su traslado al laboratorio para el análisis.

### ASLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MORFOTIPOS

Se aislaron por recuento en placa de cultivo los morfotipos, preparando una serie de dilución consecutiva entre  $10^{-2}$  y  $10^{-4}$ . Se sembró en superficie por triplicado 0.1 ml de la dilución  $10^{-4}$  en el medio mínimo de Hopwood (Valencia, 1998). Las cajas de cultivo fueron incubadas por 7 días a 23°C en posición invertida. Después de la incubación se caracterizaron por su morfología macroscópica los diferentes aislamientos, registrando el número de unidades formadoras de colonia (U.F.C.) de cada uno.

La caracterización morfotípica macroscópica se llevó a cabo por observación en cámara de conteo de colonias, determinando coloración de la colonia (anverso y reverso), presencia o ausencia de halos de inhibición, superficie, densidad, consistencia, forma, elevación, borde y diámetro. En la caracterización microscópica se determinó coloración de Gram, forma y estructuras microscópicas particulares (esporangios, esporas móviles, etc). A partir de aislamientos primarios se obtuvieron aislamientos puros por repique de la colonia.

### EXTRACCIÓN DE DNA DE COLONIAS

Se extrajo DNA genómico a partir de los aislamientos puros, resuspendiendo aproximadamente 5 mg de micelio o esporas en 100  $\mu$ l de buffer Tris-EDTA 10:1 (TE).

Se adicionaron 5 µl de lisozima SIGMA (concentración final de 50 mg/ml), incubando por cuarenta y cinco minutos a 37°C. Se agregaron 5 µl de proteinasa K QUIAGEN (concentración final 20 mg/ml) y 20 µl de dodecil sulfato de sodio (SDS) 20%, incubando nuevamente por dos horas a 55°C. Posteriormente se adicionaron 70 µl de NaCl 5M y se enfrió en hielo. Se adicionaron 170 µl de cloroformo (0.8 Vol.). Se centrifugaron las muestras por quince minutos a 14.000 rpm. Se transfirió la fase superior a un tubo nuevo, adicionando 9 µl de isopropanol frío y precipitando el DNA a -20°C toda la noche. Se centrifugó por veinte minutos a 14.000 rpm. Se lavó el DNA con 60 µl de etanol a 70% frío y se centrifugó nuevamente cinco minutos a 14.000 rpm. Después de secar, el DNA se resuspendió en 30 µl de TE (10:1).

### EXTRACCIÓN DE DNA TOTAL DE SUELO

Para la extracción de DNA de suelo se siguió el protocolo de extracción por lisis directa propuesto por Wenzl *et al* (comunicación personal). Se partió de una cantidad inicial de 4 g de suelo fresco, disolviendo el producto final en 50 µl de TE pH 8.0 (10:1). Después del proceso de extracción se hizo una segunda limpieza para algunas muestras con CaCl<sub>2</sub>, fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (PCI, 25:24:1), o ambas. El DNA total se visualizó por electroforesis en geles de agarosa a 0.8% y se cuantificó por fluorometría. Según la concentración de DNA las muestras se diluyeron hasta una concentración de 20 ng/µl.

### AMPLIFICACIÓN POR PCR

Para la amplificación de DNA de colonia se utilizaron los cebadores específicos F243 y R513 (Heuer *et al*, 1997). En una mezcla de reacción de 23 µl se adicionaron 1 µl de DNA total (en una concentración inferior a 20ng/µl), Buffer minus Mg para PCR 1X (GIBCO BRL), MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM (GIBCO BRL), dNTPs 0.2 mM de cada uno, cebadores 0.1µM y 1U de DNA Taq polimerasa recombinante (GIBCO BRL). Después de una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, se realizaron 35 ciclos de un minuto a 94°C, un minuto a 63°C y dos minutos a 72°C, finalizando con una extensión de diez minutos a 72°C.

Para la amplificación de DNA total de suelo se utilizaron también los cebadores F243 y R513 (Heuer *et al*, 1997). En una mezcla de reacción de 23 µl se adicionaron 20 ng de DNA total de suelo, Buffer minus Mg para PCR 1X (GIBCO BRL), MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM (GIBCO BRL), dNTPs 0.2 mM de cada uno, cebadores 0.1 µM, 1U de DNA Taq polimerasa recombinante (GIBCO BRL) y albumina de suero bovino (BSA) 2.3 ng. Después de una desnaturalización inicial de cinco minutos a 94°C, se realizaron 35 ciclos de un minuto a 94°C, un minuto a 60°C y dos minutos a 72°C, terminando con una extensión de diez minutos a 72°C. El producto de la primera amplificación fue diluido 1:50. De esta dilución se tomaron 5 µl para una segunda amplificación en una mezcla de reacción de 23 µl, conteniendo reactivos en igual concentración a la primera amplificación, aumentando en el ciclo de amplificación 0.5°C en la fase de anillamiento. Este procedimiento se repitió en una tercera amplificación con el fin de incrementar el producto de PCR.

## DIGESTIÓN DE LOS AMPLIFICADOS DE DNA TOTAL DE SUELO Y COLONIA

Para las muestras ambientales y de colonia se digirieron 3µl de producto de PCR con 5U de las enzimas de restricción *HinfI*, *EcoRI*, *TaqI* y *Mbol* en el buffer de reacción apropiado; adicionalmente, los amplificados de colonia se digirieron con *AluI*. Las digestiones fueron incubadas a 37°C en el caso de *HinfI*, *EcoRI*, *Mbol* y *AluI*, y 65°C para *TaqI*, durante dos horas, y almacenadas posteriormente a -20°C hasta la visualización.

## VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE RESTRICCIÓN Y LECTURA DE PATRONES DE RESTRICCIÓN

Los productos de restricción fueron separados en geles de acrilamida a 6% Urea 7M y teñidos con plata. 5 µl de la digestión se mezclaron con 2 µl de solución STOP y se desnaturalizaron por tres minutos a 95°C. En cada pozo se sembraron 2 µl de muestra y se incluyó un marcador de peso molecular de 25 bp (GIBCO BRL) en cada extremo del gel. La electroforesis se corrió a 50°C y 110 w por 1:00 a 1:30 horas. Una vez desmontado el gel fue teñido con plata. Para el análisis de los patrones de restricción se generó una imagen digitalizada del gel, analizándola con el software Kodak Digital Science 1D (versión 2.0.3). A partir de los geles se construyeron las matrices de datos con las que se realizaron los análisis de agrupamiento.

## RESULTADOS

### CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD CULTIVABLE DE *Streptomyces* POR RECuento EN PLACA DE CULTIVOS

Se aislaron y caracterizaron con base en su morfología macro y microscópica 26 morfotipos de la clase *Actinobacteria*, los cuales correspondieron a 5 géneros, siendo *Streptomyces* el más representativo de la clase con 14 aislamientos, representando 53.8% de la comunidad total. Le siguen en importancia *Nocardia* (7 morfotipos), *Streptosporangium* (3 morfotipos) y *Micromonospora* y *Microbiospora* (1 morfotipo cada uno). La composición de la comunidad de Actinomicetos y el porcentaje de representación de *Streptomyces* en las diferentes coberturas vegetales se presenta en la tabla 1.

| Género                   | Número de morfotipos | Porcentaje de representación en la comunidad de Actinomicetos |
|--------------------------|----------------------|---|
| <i>Streptomyces</i>      | 14                   | 53.8  |
| <i>Nocardia</i>          | 7                    | 26.9  |
| <i>Streptosporangium</i> | 3                    | 11.5  |
| <i>Microbiospora</i>     | 1                    | 3.8   |
| <i>Micromonospora</i>    | 1                    | 3.8   |
| Total                    | 26                   | 100   |

Tabla 1. Composición y porcentaje de representación de los géneros aislados dentro de la comunidad de Actinomicetos.

Considerando exclusivamente los resultados obtenidos para *Streptomyces*, la abundancia del género en las diferentes coberturas vegetales se muestra en la tabla 2. El cafetal con guamo y plátano es la cobertura con mayor abundancia, seguido en su

orden por bosque, pasturas, gradual, cafetal con guamo y cafetal sin sombrío. Para todos las coberturas la abundancia estuvo en el orden de magnitud de 105 U.F.C. por gramo de suelo, coincidiendo con lo reportado para el género en otros estudios (Xu et al, 1996; Sylvia et al, 1998).

| Cobertura                | Abundancia <i>Streptomyces</i> (x105) |
|--------------------------|---------------------------------------|
| Bosque                   | 4.21 ± 1.46                           |
| Café sin sombrío         | 1.10 ± 0.42                           |
| Café con guamo           | 1.38 ± 0.71                           |
| Café con guamo y plátano | 6.85 ± 2.32                           |
| Gradual                  | 3.13 ± 1.06                           |
| Pasturas                 | 4.06 ± 1.66                           |

Tabla 2. Abundancia de *Streptomyces* ± desviación estándar (U.F.C. por gramo de suelo) para las diferentes coberturas vegetales analizadas.

Como se observa en la tabla 2, la abundancia se modifica en las diferentes coberturas. Al hacer un análisis de varianza de este factor se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas (tabla 3).

| Fuente de Variación      | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrados medios | F     | Probabilidad de F |
|--------------------------|-------------------|--------------------|------------------|-------|-------------------|
| Entre coberturas         | 0.31              | 5                  | 0.06             | 2.91* | 0.043             |
| Dentro de las coberturas | 0.38              | 18                 | 0.02             |       |                   |
| Total                    | 0.69              | 23                 |                  |       |                   |

Tabla 3. Análisis de varianza con un  $\alpha = 0.05$ , para los valores de abundancia de *Streptomyces* entre las coberturas vegetales analizadas.

A partir de la abundancia de cada morfotipo en las diferentes coberturas vegetales se estimaron el índice de diversidad de Shannon ( $H'$ ) y el índice de dominancia de Simpson ( $D$ ) (Krebs, 1985; Ludwig y Reynolds, 1988). Como se observa en la tabla 4, la diversidad más alta se presenta en el gradual, seguido por el cafetal sin sombrío, bosque, cafetal con guamo y cafetal con guamo y plátano.

| Cobertura                | $H'$ | $D$  |
|--------------------------|------|------|
| Bosque                   | 1.46 | 0.35 |
| Café sin sombrío         | 1.68 | 0.20 |
| Café con guamo           | 1.31 | 0.33 |
| Café con guamo y plátano | 0.81 | 0.60 |
| Gradual                  | 1.96 | 0.16 |
| Pasturas                 | 1.32 | 0.42 |

Tabla 4. Índices de diversidad de Shannon ( $H' = -\sum p_i(\log p_i)$ ) y Dominancia de Simpson  $D = \sum (n_i/N)^2$ , para las coberturas vegetales analizadas.

Los caracteres morfológicos macro y microscópicos no son suficientes para determinar los aislamientos. No obstante, Küster (1976) propone la determinación de grupos o series taxonómicas para el análisis ecológico de las comunidades de *Streptomyces*. Siguiendo el sistema de clasificación de series morfológicas propuesto por Szabó (1974), se agruparon los 14 aislamientos de *Streptomyces* en seis series morfológicas (tabla 5).

| Morfotipo | Esporoforo esporas | Serie color micelio sustrato | Coloración de la serie       | Nombre          |
|-----------|--------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------|
| 2         | Spira              | Niveus                       | Amarillo-café                | Albus           |
| 10        |                    |                              | Amarillo-café                | Albus-Sterilias |
| 12        |                    |                              | Amarillo-café                | Albus-Sterilis  |
| 20        | Spira              | Niveus                       | Amarillo-café                | Albus           |
| 24        | Spira              | Cinereus                     | Amarillo-café                | Aureofaciens    |
| 34        | Spira              | Niveus                       | Amarillo-café                | Albus           |
| 35        | Spira              | Niveus                       | Amarillo-café                | Albus           |
| 37        | Spira              | Cinereus                     | Amarillo-café                | Aureofaciens    |
| 39        | Spira              | Cinereus                     | Amarillo-café                | Aureofaciens    |
| 44        | Spira              | Niveus                       | Amarillo-café                | Albus           |
| 48        | Spira              | Violaceus                    | Amarillo-café y azul o verde | Violaceus       |
| 56        | Spira              | Griseus                      | Amarillo-café                | Flavidovirens   |
| 59        | Rectus-flexibilis  | Cinnamomeus                  | Amarillo-café y rojo         | Fragilis        |
| 60        |                    |                              | Amarillo-café                | Albus-Sterilis  |

Tabla 5. Separación de los diferentes morfotipos de *Streptomyces* aislados en series ecológicas según Szabó (1974).

Al analizar su presencia en las coberturas se observa que se presentan dos tipos de grupos de series morfológicas (tabla 6). Los grupos generalistas se encuentran en cualquier cobertura vegetal, mientras que los grupos específicos se restringen a coberturas con características particulares. Dentro de la primera categoría encontramos las series Albus-Sterilis, Albus y Aureofaciens. En la segunda pueden enumerarse las series violaceus, fragilis y flavidovirens, ésta última presente exclusivamente en los guaduales.

| Serie          | Bosque morfológica | Café sin sombrío | Café con Guamo | Café con Guamo y Plátano | Guadual | Pasturas |
|----------------|--------------------|------------------|----------------|--------------------------|---------|----------|
| Albus-Sterilis | X                  | X                | X              | X                        | X       | X        |
| Albus          | X                  | X                | X              | X                        | X       | X        |
| Violaceus      |                    |                  |                |                          | X       | X        |
| Aureofaciens   | X                  | X                | X              | X                        | X       | X        |
| Fragilis       |                    |                  | X              |                          |         | X        |
| Flavidovirens  |                    |                  |                |                          |         | X        |

Tabla 6. Distribución de las series morfológicas establecidas en las diferentes coberturas vegetales analizadas

**CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD CULTIVABLE DE *Streptomyces* POR PCR-RFLP**  
En cultivo puro se recuperaron 12 morfotipos para la caracterización molecular de la

comunidad cultivable por un análisis de restricción de amplificados del DNA ribosomal (PCR-RFLP), considerando independientemente los patrones generados con tres enzimas de restricción diferentes que generaron patrones polimórficos. Cada aislamiento se identificó según su patrón de PCR-RFLP, definido con base en la presencia y ausencia de fragmentos de restricción.

Considerando la composición de las diferentes coberturas teniendo en cuenta los 12 morfotipos puros obtenidos, se determinó la diversidad genética por el índice de Nei (1987) para la fracción cultivable de la comunidad. En la tabla 7 se resume la diversidad genética para cada cobertura, así como el número de morfotipos presentes.

| Cobertura                | Número de morfotipos | Diversidad genética |
|--------------------------|----------------------|---------------------|
| Bosque                   | 9                    | 0.27                |
| Café sin sombrero        | 6                    | 0.23                |
| Café con guamo           | 5                    | 0.28                |
| Café con guamo y plátano | 6                    | 0.17                |
| Guadual                  | 8                    | 0.23                |
| Pasturas                 | 8                    | 0.23                |

Tabla 7. Número de morfotipos y diversidad genética por el índice de Nei  $h=1-\sum ix^2$ , de la comunidad cultivable en cada cobertura vegetal.

#### CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD DE *Streptomyces* A PARTIR DEL ANÁLISIS DE DNA TOTAL DEL SUELO

Para el análisis de las comunidades no cultivables de *Streptomyces* se consideró la complejidad en el patrón de PCR-RFLP obtenido como medida de la diversidad genética. En este sentido se analizaron el número total de bandas en el patrón, el número de bandas únicas y el número de bandas compartidas con otras coberturas, para definir la diversidad genética de la comunidad en las diferentes coberturas vegetales. Según los resultados los bosques son la cobertura con mayor diversidad genética, en comparación con los guaduales y los cafetales con guamo y plátano (tabla 8).

| Cobertura                | No. total de bandas | No. de bandas únicas | No. de bandas compartidas |
|--------------------------|---------------------|----------------------|---------------------------|
| Bosque                   | 113                 | 23                   | 10                        |
| Café sin sombrero        | 93                  | 17                   | 8                         |
| Café con guamo           | 91                  | 14                   | 15                        |
| Café con guamo y plátano | 53                  | 9                    | 9                         |
| Guadual                  | 45                  | 1                    | 3                         |
| Pasturas                 | 84                  | 3                    | 7                         |

Tabla 8. Número total de bandas y frecuencia relativa de las mismas para el análisis de DNA comunitario de cada cobertura vegetal.

Con base en los patrones de PCR-RFLP para cada cobertura se realizó un análisis de agrupamiento. Se consideró el índice de similaridad de Dice y la estrategia de agrupamiento de fusión por promedios aritméticos (UPGMA).

## DISCUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos se observa que las modificaciones en la cobertura vegetal afectan las comunidades edáficas de *Streptomyces*, conduciendo a cambios en la abundancia y diversidad morfológica y genética del género.

En los bosques la aparición de diferentes microhábitats en la matriz del suelo, relacionada directamente con la diversidad de la vegetación en esta cobertura, conduce al mantenimiento de una comunidad con una alta diversidad en términos morfológicos y moleculares. Teniendo como referencia los bosques, se presenta como tendencia general la disminución en la diversidad genética de la comunidad, relacionada con la simplificación de la cobertura vegetal.

En concordancia con la tendencia general y considerando los pastos y los guaduales como las coberturas más simples debido a la dominancia de un tipo particular de vegetación, se presentan para estas coberturas los valores más bajos de diversidad genética del género *Streptomyces*. En términos morfológicos se presentan resultados totalmente opuestos, en donde se obtienen los mayores valores de diversidad morfológica.

Se ha establecido previamente que los pastos son una cobertura que ofrece unas condiciones particulares para las comunidades edáficas de *Streptomyces*. En los pastizales la habilidad en la degradación de celulosa (Antai y Crawford, 1981) y el porcentaje de germinación de las esporas (Lloyd, 1969), es superior a la de las coberturas con vegetación leñosa. De esta forma, el tipo de vegetación en los pastos puede estar determinando la abundancia y la diversidad morfológica observadas, llevándolos a ser comparables en estos términos con las coberturas naturales como los bosques.

Aunque no existen reportes previos, podría pensarse que los mismos elementos que favorecen la diversidad morfológica del género *Streptomyces* en los pastos influyan sobre la diversidad de la comunidad en los guaduales, considerando la similitud que puede existir entre estas dos coberturas, desde el punto de vista de la vegetación. La relación de pastos y guaduales se evidencia en la presencia de un grupo morfológico común y exclusivo a estas coberturas (serie *Violaceus*), en donde podría llegar incluso a equiparar a los guaduales con un monocultivo natural definido como "pasto gigante".

Tanto en términos morfológicos como genéticos las comunidades de *Streptomyces* en los cafetales sin sombrío y los cafetales con guamo, presentan valores altos de diversidad. Al ser estas coberturas manejadas por el hombre es importante considerar la influencia que pueda tener su manejo sobre la diversidad de las comunidades del género, en donde puede haber una importación neta de diversidad a través de la fertilización con abonos orgánicos, los cuales son también hábitats comunes de *Streptomyces*, por ejemplo, el compost (Waksman, 1967; Goodfellow y Williams, 1983).

Las modificaciones en las comunidades edáficas de *Streptomyces* en los cafetales con guamo y plátano, con relación a las comunidades de los otros dos tipos de cultivo de

café, en donde se presenta una comunidad caracterizada por los mayores valores de abundancia del género y la menor diversidad morfológica y genética, se relacionan con cambios en la oferta de recursos aprovechables por las comunidades microbianas en esta cobertura. En los cafetales con guamo y plátano las hojas de este último se dejan caer al suelo en donde proveen un nuevo recurso aprovechable por *Streptomyces*. Este recurso conduce al aumento en la abundancia de un grupo particular de organismos del género capaces de utilizarlo, lo que redundará en un aumento de la dominancia y una disminución de la diversidad, en este caso tanto morfológica como molecular.

Al analizar las coberturas como conjunto dentro del paisaje, el agrupamiento de las réplicas con base en los patrones de PCR-RFLP para DNA total de suelo, evidencia como éstas son elementos interconectados, pudiendo haber un intercambio de elementos de la comunidad a través de mecanismos naturales (dispersión de las esporas por el viento, agua o la edafofauna macrobiológica), o movimientos determinados por las prácticas de manejo de los agroecosistemas. Esta interconexión evidenciada desde una aproximación molecular, puede verse también en los resultados morfológicos, en donde la presencia de series generalistas muestra el intercambio de elementos de la comunidad que puede existir entre las coberturas vegetales.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren expresar sus agradecimientos a Colciencias y al Instituto Alexander von Humboldt por la financiación de este proyecto. Así mismo al personal de la Unidad de Biotecnología del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), al Laboratorio de Física de Suelos del CIAT y al laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia.

### BIBLIOGRAFÍA

- ANTAI S. P. y CRAWFORD D. L. 1981. Degradation of Softwood, Hardwood, and Grass Lignocelluloses by two *Streptomyces* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 42(2): 378-380.
- CHUN J., TOUN H. D., TIM Y. I., LEE H., KIM M. Y., HALT Y. C. y KANG S. O. 1997. *Streptomyces seoulensis* sp nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 (2): 492-498.
- CULLUM J., FLETT F. y PIENDL W. 1988. Genetic Instability in *Streptomyces*. *Microbiol. Sci.* 5(7): 233-235.
- GOODFELLOW M. y WILLIAMS S. T. 1983. Ecology of Actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* 37: 189-216.
- HEAD I. M., SAUNDERS J. R. y PICKUP R. W. 1998. Microbial Evolution, Diversity and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms. *Microb. Ecol.* 35:1-21.
- HEUER H., KRSEK M., BAKER P., SMALLA K. y WELLINGTON E. 1997. Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(8): 3233-3241.

- KORN-WENDISCH F. y KUTZNER H. J. 1991. The Family Sterptomycetaceae. En: Balows A., Trüper H. G., Dvirkin M., Harder W. y Schleifer K. H. The Prokaryotes Volume I. 2º Ed. Springer-Verlag. Germany.
- KREBS C. 1985. Ecología, Estudio de la Distribución y la Abundancia. Harla, Haper y Row Latinoamericana. Segunda edición. Madrid.
- KÜSTER E. 1976. Ecology and Predominance of Soil Streptomycetes. En: Arai T. Actinomycetes, the Boundary Organisms. Tokyo.
- LLOYD A. B. 1969. Behavior of Streptomycetes in Soil. J. Gen. Microbiol. 56: 165-170.
- LUDWIG J. y REYNOLDS J. 1988. Statistical Ecology, a Primer on Methods and Computing. John Wiley y Sons. New York.
- MADIGAN M., MARTINKO J. y PARKER J. 1998. Brock, Biología de los Microorganismos. Octava edición. Prentice Hall. Barcelona.
- MARÍN G. 1986. Fertilidad de Suelos con Énfasis en Colombia. Manual de Asistencia Técnica No 039. Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. Bogotá.
- MORGAN J. y WINSTANLEY C. 1997. Microbial Biomarkers. En: Van Elsas J., Trevors J. y Wellington E. Modern Soil Microbiology. Marcel Dekker. New York.
- NEI M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press. New York.
- ROSADO A., DUARTE G., SELDIN L. y Van ELAS J. 1997. Molecular Microbial Ecology: A Minireview. Revista de Microbiología 28: 135-147.
- STACKEBRANDT E., RAINEY F. A. y WARD-RAINEY N. L. 1997. Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actinobacteria classis nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 47 (2): 479-491.
- SYLVIA D, FUHRMANN J., HARTEL P. y ZUBERER D. 1998. Principles and Applications of Soil Microbiology. Prentice Hall. New Jersey.
- SZABO I. M. 1974. Microbial Communities in Forest-Rendzina Ecosystem, the Pattern of Microbial Communities. AKADEMIAI KIADÓ. Budapest.
- VALENCIA H. 1998. Manual de Prácticas de Laboratorio de Microbiología General. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Biología. Bogotá.
- VALLAËYS T., PERSELLO-CARTIEAUX F., ROUARD N., LORS C., LAGUERRE G. y SOULAS G. 1997. PCR-RFLP Analysis of 16S rRNA, tfdA and tfdB Genes Reveals a Diversity of 2,4-d Degradars in Soil Aggregates. FEMS Microbiol. Ecol. 24: 269-278.
- WAKSMAN S. y HENRICI A. T. 1947. The Nomenclature and Classification of the Actinomycetes. J. Bacteriol. 46: 337-341.
- \_\_\_\_\_. 1967. The Actinomycetes, A Summary of Current Knowledge. The Ronald Press Company. New York.
- XU L-H., LI Q-R y JIANG C-L. 1996. Diversity of Soil Actinomycetes in Yunnan China. Appl. Environ. Microbiol. 6(1): 244-248.