

GÉNEROS BACTERIANOS DOMINANTES EN LOS ESTRATOS FOLIARES DEL TABACO CURADO PARA CAPAS. INFLUENCIA DE LA NICOTINA Y EL pH SOBRE SU DENSIDAD POBLACIONAL

Dominant bacterial genera in tobacco leaf positions of cured tobacco for wrapper. Influence of nicotine and pH in their population density

Yunior M. Morán Gómez[✉], Daylin Fleitas Gutiérrez, Rosario Domínguez Larrinaga, Martín M. Cuervo Fernández, José M. Guardiola Pedroso e Isabel Márquez Leyva

ABSTRACT. Although the essential role of bacteria in tobacco fermentation process, in Cuba never has been identified the genera present in the cured tobacco for wrapper, neither the variables that affect their populations. This knowledge will be aid to management the process in which the microorganisms are involved. The objective of this research was to determine the relationship between population density of the bacterial genera with dominant populations in cured tobacco leaves of different leaf positions of the stalk and nicotine concentrations and pH values in these environments. The isolation and generic identification of bacterial microbiota was done for each tobacco leaves positions and pH values and nicotine concentrations were obtained too. Members of the genus *Bacillus* were isolated in all leaf positions. *Staphylococcus* members were not isolated at the «leaf» tobacco stalk positions. Representatives of the *Arthrobacter* genus were isolated only in both leaves positions «cutters» and «leaf». *Bacillus* populations were always higher than the other genera isolated. Nicotine was significantly increase and pH was show a slight nonsignificant ($p < 0,01$) decrease, the population density of bacteria isolated in all genres decreased from lowest to highest leaf positions. The regression model reveals that the decrease in population density of bacterial genera that is appraised to climb different leaves positions is more related to the increased of nicotine concentration in the leaves than with the variation of pH.

Key words: tobacco, leaves, bacteria, pH, nicotine

RESUMEN. Aunque las bacterias juegan un papel importante en el proceso fermentativo del tabaco, en Cuba no se han identificado los géneros presentes en el tabaco curado para capas, ni las variables que afectan a sus poblaciones. Este conocimiento pudiera contribuir al manejo de los procesos en los que estos microorganismos intervienen. El objetivo de esta investigación fue determinar la relación que existe entre la densidad poblacional de los géneros bacterianos dominantes en los diferentes estratos foliares de la planta de tabaco luego de la curación y la concentración de nicotina y los valores de pH en estos ambientes. Se realizó el aislamiento e identificación genérica de la microbiota bacteriana y se determinó el contenido de nicotina y el pH de las hojas de tabaco para cada estrato foliar. Las poblaciones de *Bacillus* en todos los estratos foliares siempre fueron superiores a otros géneros aislados como *Staphylococcus* y *Arthrobacter*. Desde los niveles foliares inferiores hasta los superiores el contenido de nicotina se incrementó significativamente, el pH mostró una ligera disminución (no significativa $p < 0,01$) y disminuyó la densidad poblacional de bacterias de todos los géneros aislados. El modelo de regresión reveló que la disminución de la densidad poblacional de los géneros bacterianos que se aprecia al ascender por los diferentes niveles foliares estuvo más relacionada con el incremento de la concentración de nicotina en las hojas que con la variación del pH.

Palabras clave: tabaco, hojas, bacteria, pH, nicotina

Yunior M. Morán Gómez, Investigador Auxiliar; Daylin Fleitas Gutiérrez, Reserva Científica; Rosario Domínguez Larrinaga, Investigador Agregado; Martín M. Cuervo Fernández, Investigador Auxiliar de la UCTB de Mejoramiento Genético y Fitopatología; José M. Guardiola Pedroso e Isabel Márquez Leyva, Especialistas A de la UCTB de Pre-Industria e Industria, Instituto de Investigaciones del Tabaco (IIT), carretera a Tumbadero, km 8½, San Antonio de los Baños, Artemisa, CP 32500.

✉ biologia8@iitabaco.co.cu

INTRODUCCIÓN

La obtención y selección de las hojas que se emplean como capas para la producción de los tabacos Premium es un proceso muy riguroso. Las hojas de la planta de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), cultivadas bajo tela, se recolectan en el campo por estratos o pisos

foliares (también se les denomina «cortes»), los cuales desde la base al ápice de la planta se denominan, «Libre pie», «Uno y medio», «Centro Ligerito», «Centro Fino», «Centro Gordo» y «Corona». Después de la recolección, las hojas se disponen en cujes colgando por el peciolo dentro de las casas de curación artificial donde se desecan, en condiciones controladas de temperatura y humedad, dando lugar al tabaco curado (1).

Luego, durante el acopio, el tabaco curado para capas de un mismo estrato foliar se zafa de los cujes y se agrupa en gavillas (grupos de 35 a 40 hojas estrechamente amarradas por el peciolo). Estas gavillas son colocadas en cajas de cartón y se les aplica un proceso de fermentación en estado sólido en aposentos con condiciones controladas de temperatura y humedad (1). Este proceso produce profundas transformaciones químicas, físicas y organolépticas en la materia prima y es determinante para alcanzar un producto de calidad (2).

Actualmente, es ampliamente reconocida la importancia de las bacterias en las transformaciones del tabaco curado durante el proceso fermentativo (2, 3, 4, 5, 6, 7). En Cuba, aunque se han realizado algunas investigaciones para determinar los grupos microbianos presentes en el proceso fermentativo del tabaco para tripas (2, 5), se desconocen los microorganismos que intervienen en el proceso fermentativo del tabaco curado para capas, el papel que estos juegan en el proceso y las variables que afectan a sus poblaciones.

El discernimiento de estos aspectos pudiera contribuir a que en el futuro se pudiera hacer un manejo eficiente de los procesos en los que intervienen estos microorganismos, incrementando la acción de los grupos beneficiosos y disminuyendo los perjudiciales (5). En este sentido, la concentración de nicotina y los valores del pH de las hojas curadas pudieran ser elementos a tener en cuenta en el manejo de las diferentes poblaciones de microorganismos que viven en estos ambientes.

Las hojas curadas tienen elevados contenidos de componentes nitrogenados del tipo alcaloides, donde la nicotina es el representante principal (8). Se plantea que la concentración de nicotina del tabaco varía con el tipo de tabaco, con las condiciones ambientales y entre los pisos foliares, entre otros factores (8, 9, 10). Investigaciones encaminadas a determinar el efecto de la nicotina sobre algunos microorganismos de la microbiota humana, indican que este alcaloide influye negativamente en el crecimiento y la viabilidad de varios de los grupos microbianos presentes en estos ambientes (11, 12).

La nicotina es una base nitrogenada y su reacción es fuertemente alcalina (pH de 10.2 en solución acuosa) (9), por lo que en el tabaco curado pudieran darse condiciones para que los valores del pH sean diferentes entre los diferentes pisos foliares. Como cada especie en particular de microorganismos presenta un rango de pH óptimo para su desarrollo (13), es de esperar que, de existir estas variaciones, pudiera ser diferente la composición de microorganismos en los diferentes pisos foliares.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar la relación que existe entre la densidad poblacional de los géneros bacterianos dominantes en las hojas del tabaco curado para capas de los diferentes estratos foliares y la concentración de nicotina y los valores de pH de estos ambientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

UNIVERSO DE TRABAJO

Se trabajó con hojas de tabaco negro tapado en la escogida de Navajas, del municipio «Pedro Betancourt» en la provincia de Matanzas. El tabaco se encontraba clasificado por estratos foliares y almacenado en cajas de cartón a una temperatura ambiente de alrededor de 25°C en espera del primer proceso de fermentación controlada. Las cajas tenían 70 cm de ancho, 113 cm de largo y 36 cm de alto. Las hojas de tabaco curado de cada corte se encontraban agrupadas en gavillas. Los cortes estudiados fueron «Libre pie», «Uno y medio», «Centro Ligerito», «Centro Fino» y «Centro Gordo», según la clasificación empleada por (1).

MUESTREO

Por cada corte se muestrearon dos cajas. De cada caja se tomó una gavilla, y las dos gavillas de cada corte fueron trasladadas al laboratorio para su procesamiento en una bolsa sellada de nylon.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Procesamiento de las muestras

En una cabina de flujo laminar se procesaron cada una de las muestras obtenidas de cada piso foliar. Del centro del grupo de hojas, de cada gavilla muestreada por cada corte, se separaron cinco hojas y de cada una se tomaron 15 muestras distribuidas por toda el área foliar. Para esto se empleó un horador de metal 0,5 cm de diámetro. Las muestras colectadas de las cinco hojas se mezclaron bien y se pesaron hasta completar 5 g de tabaco. Estos se transfirieron a un frasco Enlarmeyer con 50 mL de solución salina estéril (SSE). La muestra así obtenida se maceró a 25°C durante dos horas con agitación constante a 100 rpm en una incubadora con zaranda orbital marca HT-INFORS-AG modelo Minitron AT-72. Todos los procedimientos se realizaron en condiciones asépticas.

A continuación se realizaron diluciones seriadas del macerado en orden de diez. Para esto se transfirió 1 mL del macerado a un tubo de ensayo con tapa de rosca con 9 mL de SSE y se homogenizó con un vortex a una velocidad máxima de 300 rpm durante 30 segundos. De este tubo se tomó 1 mL y se repitió la misma operación hasta completar cinco diluciones.

Aislamiento de algunos representantes de la microbiota del tabaco que crecen en el medio de cultivo

De los tubos correspondientes a las cinco primeras diluciones del macerado se tomaron 100 μL y se esparcieron en placas Petri (de 90 mm de diámetro) con medio de cultivo agar nutriente (AN). El inóculo se dispersó con espátula de Drigalsky. Las placas se incubaron durante 72 horas a 25°C.

Purificación y caracterización morfocultural de los aislados

La purificación de los aislados se realizó en base a las diferentes características culturales mostradas por las colonias crecidas en las placas de medio AN a los tres días de incubadas. Los criterios tomados en consideración para la selección de los diferentes aislados fueron los sugeridos por Harrigan y McCance (14). Solo se tuvieron en cuenta para la purificación las diluciones donde el número total de colonias por placa se encontraba entre 20 y 200. La observación de las colonias se realizó al microscopio estereoscópico con un aumento de 70x. Cada colonia morfológicamente diferente se purificó por agotamiento en placas de AN.

Recuento de viables

Paralelamente a la purificación de los diferentes aislados, en las placas del aislamiento que se emplearon en la purificación, se cuantificó el número de colonias total que creció en cada placa por método de recuento de viables en placas (15). También se cuantificó, para cada tipo particular de aislado purificado, el número de colonias con iguales características que creció en cada placa. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias por gramo de tabaco ($\text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$). Se estableció como microbiota dominante aquel conjunto de individuos que creció en la última dilución contable.

Caracterización tintorial, fisiológica y bioquímica de los aislados purificados

Los aislados purificados se caracterizaron mediante diversas pruebas tintoriales, fisiológicas y bioquímicas, las que ofrecieron criterios de identificación hasta el nivel de género.

Las pruebas fueron: hidrólisis del almidón, licuefacción de la gelatina, oxidación y fermentación de glucosa (Test de Hugh y Leifson), tioglicolato; catalasa, la reducción de nitratos, el crecimiento en NaCl y la relación con la temperatura, todas según Harrigan y McCance (14). La respuesta a la tinción de Gram se realizó según criterio de otros autores (15).

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE NICOTINA Y PH DE LAS HOJAS DE TABACO CURADO

Un total de 40 hojas de cada muestra se transfirieron al laboratorio de análisis químico para determinar el contenido de nicotina y el pH.

Los alcaloides totales de la hoja expresados como nicotina y el pH se determinaron según (16, 17), respectivamente.

Procesamiento estadístico de los resultados

Los resultados se procesaron empleando el programa «GraphPad InStat version 3.06» (18). La comparación de las medias de la concentración de nicotina de cada piso foliar y de los valores de pH se realizaron mediante análisis de varianza no paramétricos (Kruskal-Wallis) seguidos de la prueba de comparación múltiple de medias de Dunn. El gráfico tridimensional de la relación entre la población bacteriana con la concentración de nicotina y el pH se realizó con el paquete estadístico *Statistic StatSoft* version 9.0 (19). Para ello se utilizaron los resultados del análisis de regresión múltiple realizado a los datos de la media de la población bacteriana de la hoja de tabaco en cada corte (variable dependiente) y a los datos de las medias de la concentración de nicotina y los valores de pH por corte (variables independientes).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

COMPOSICIÓN EN GÉNEROS DE LA MICROBIOTA BACTERIANA DOMINANTE EN LOS DIFERENTES CORTES DEL TABACO CURADO PARA CAPAS

Muy pocas investigaciones han abordado la composición en géneros de la microbiota natural del tabaco cubano, y las que lo han hecho, se han enfocado en el proceso fermentativo de la materia prima empleada para la tripa y no en los géneros presentes en las hojas para capa que se emplean en la industria del torcido de exportación (2, 5). Por estas razones, el presente estudio es el primero en tratar tan importante tema.

Las diferencias fenotípicas observadas en las colonias de los aislados purificados de cada corte se confirmaron con los resultados de las diferentes pruebas morfotintoriales, bioquímicas y fisiológicas realizadas a cada uno de ellos. En general, todos los microorganismos aislados y purificados en este estudio se ubicaron en tres géneros de bacterias Gram positivas.

Aquellos aislados que, entre otras características, se distinguieron por ser bacilos esporógenos Gram positivos, móviles y anaerobios facultativos, que toleraron el NaCl a un 7 %, hidrolizaron el almidón y la gelatina, resultaron catalasa positivos, redujeron los nitritos a nitratos, fermentaron la glucosa produciendo ácido pero no gas, y su temperatura óptima de crecimiento estuvo entre los 25-40°C, fueron ubicados en el género *Bacillus* Cohn, de acuerdo con las claves de identificación del Manual de Bergey's de 1986 en los acápites correspondientes a los bacilos Gram-positivos esporulados (20).

Otro grupo de aislados se caracterizó por ser bacterias esféricas Gram positivas que crecieron bien en agar nutriente y se observaron al microscopio óptico en masas de células irregularmente agrupadas como racimos

de uvas y en parejas. Estos aislados que se comportaron como anaerobios facultativos, catalasa positivos, fermentadores de la glucosa, toleraron el NaCl al 2 %, y su temperatura óptima de crecimiento estuvo entre los 25-40°C, se ubicaron en el género *Staphylococcus* Rosenbach, de acuerdo con las claves de identificación del manual de Bergey's de 1986 en los acápites correspondientes a los cocos Gram-positivos no esporulados (21).

Por último, aquellos aislados que en el cultivo joven tuvieron respuesta positiva a la tinción de Gram y se observaron como bacilos finos, pero que al envejecer el cultivo se mostraron pleomórficos con abundantes ramificaciones, y que entre otras características, se presentaron como no móviles, asporógenos con crecimiento en presencia de oxígeno, positivos a la prueba de la catalasa, con abundante crecimiento en NaCl al 7 %, oxidadores de la glucosa, hidrolizadores del almidón pero no de la gelatina, y su temperatura óptima de crecimiento estuvo entre los 25-35°C, fueron ubicados en el género *Arthrobacter* Conn y Dimmick, de acuerdo a las claves de identificación del Manual de Bergey's de 1986 en los acápites correspondientes a los bacilos irregulares Gram-positivos (22).

La presencia de bacterias Gram positivas en las hojas de tabaco para capa coincide con lo descrito en las hojas para tripa donde se ha informado el predominio de bacterias Gram positivas y bacilos esporógenos en los pilones de fermentación (23). Así mismo, en estudios realizados con las hojas empleadas en la confección de la tripa para la elaboración de los Habanos se han descrito especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Staphylococcus* (5, 24) y *Arthrobacter* (24).

La coincidencia de los resultados de este estudio para la capa, con los obtenidos para la tripa, en las investigaciones citadas, pudiera explicarse sobre la base de que las hojas empleadas para conformar la tripa y la capa pertenecen a los mismos cultivares de tabaco negro, y solo las diferencian el hecho de que el tabaco para tripa se cultiva al sol y el tabaco para capa se cultiva bajo tela (25).

Se plantea que la abundancia relativa de bacterias Gram positivas en el tabaco curado en comparación con las bacterias Gram negativas se deba a que las primeras presentan mejores adaptaciones para sobrevivir en las condiciones de desecación a las que son expuestas, 17-19 % de humedad de la hoja (1), como son las paredes celulares más gruesas y la producción de endosporas bacterianas en algunos de sus géneros (5).

En el corte «Libre pie» se aislaron 18 tipos de colonias diferentes, con una población total de $1,46 \times 10^6$ UFC.g⁻¹. Los 14 aislados pertenecientes al género *Bacillus* fueron los que mayores densidades poblacionales alcanzaron, concentrando el 80,1% del total de individuos de la comunidad de bacterias purificadas para este corte (Tabla I). Los otros cuatro aislados purificados en este corte se ubicaron en el género *Staphylococcus*.

En el corte «Uno y medio» se aislaron 15 tipos de colonias diferentes, con una población total de $9,0 \times 10^5$ UFC.g⁻¹. Nuevamente los aislados pertenecientes al género *Bacillus* fueron los que mayores densidades poblacionales alcanzaron. De conjunto estos 13 aislados concentraron el 94,4 % del total de individuos de la comunidad de bacterias purificadas para este corte (Tabla I). Los otros dos aislados restantes se ubicaron en el género *Staphylococcus*.

En el corte «Centro Liger» se aislaron 13 tipos de colonias diferentes, con una población total de $8,1 \times 10^5$ UFC.g⁻¹. Igual que en los cortes anteriores, los aislados pertenecientes al género *Bacillus* presentaron, en conjunto, la mayor densidad poblacional de bacterias purificadas para este corte con el 93,8 % del total de individuos de la comunidad (Tabla I). Uno solo de los aislados purificados se ubicó en el género *Staphylococcus*.

En el corte «Centro Fino» se aislaron 15 tipos de colonias diferentes, con una población total de $7,2 \times 10^5$ UFC.g⁻¹. Nuevamente aquí, los 11 aislados pertenecientes al género *Bacillus* fueron los que mayores densidades poblacionales alcanzaron con el 86,1 % del total de individuos de la comunidad de bacterias purificadas para este corte (Tabla I). En este corte se purificaron además tres aislados pertenecientes al género *Arthrobacter* (suman en conjunto el 11,1 % de la microbiota aislada) y un aislado que se ubicó en el género *Staphylococcus*.

En el corte «Centro Gordo» se aislaron 16 tipos de colonias diferentes, con una población total de $3,0 \times 10^5$ UFC.g⁻¹. De conjunto, en los 12 aislados ubicados en el género *Bacillus* se concentró el 83,3 % del total de individuos de la comunidad de bacterias purificadas para este corte (Tabla I). El resto de los aislados purificados se ubicaron en el género *Arthrobacter*.

De modo general, cuando se comparó la densidad total de individuos que constituye la microbiota bacteriana dominante en los diferentes pisos foliares del tabaco curado, se apreció que en la medida que se ascendía por los estratos foliares de la planta disminuía el número total de individuos por gramo de hojas.

Cuando se hizo un análisis por géneros se observó que el total de individuos de las poblaciones de *Bacillus* resultaron mayoría en cada corte. A pesar de ello, cuando se compararon ascendentemente los pisos foliares, estas poblaciones mostraron el mismo comportamiento descrito anteriormente, ya que iban disminuyendo su densidad de individuos por gramo de hojas.

Las poblaciones del género *Staphylococcus* siempre resultaron minoritarias cuando se compararon con las del género *Bacillus*. Estas mostraron igual tendencia hacia la disminución de su densidad poblacional en la medida que se ascendía por los pisos foliares. En las hojas pertenecientes al corte «Centro Gordo» no se recuperaron individuos de este género.

Las colonias pertenecientes al género *Arthrobacter* solo se observaron en los cortes superiores («Centro Fino» y «Centro Gordo»).

Tabla I. Densidad poblacional de los diferentes aislados purificados en las placas de AN a partir de las muestras obtenidas de las hojas curadas de los diferentes estratos foliares del tabaco negro cubano para capa

Libre pie		Uno y medio		Centro Ligero		Centro Fino		Centro Gordo	
Aislado	Densidad	Aislado	Densidad	Aislado	Densidad	Aislado	Densidad	Aislado	Densidad
1LP	21 (S)*	46UM	9 (B)	61CL	10 (B)	74CF	25 (B)	89CG	1 (B)
2LP	4 (B)	47UM	4 (B)	62CL	7 (B)	75CF	5 (B)	90CG	2 (B)
3LP	2 (S)	48UM	12 (B)	63CL	16 (B)	76CF	5 (B)	91CG	1 (A)
4LP	3 (B)	49UM	15 (B)	64CL	5 (S)	77CF	2 (B)	92CG	2 (B)
5LP	9 (B)	50UM	2 (B)	65CL	2 (B)	78CF	2 (S)	93CG	4 (B)
6LP	20 (B)	51UM	10 (B)	66CL	1 (B)	79CF	8 (B)	94CG	1 (B)
7LP	3 (B)	52UM	4 (B)	67CL	7 (B)	80CF	2 (A)	95CG	2 (A)
8LP	18 (B)	53UM	9 (B)	68CL	11 (B)	81CF	1 (B)	96CG	2 (B)
36LP	3 (B)	54UM	12 (B)	69CL	8 (B)	82CF	3 (B)	97CG	3 (B)
37LP	14 (B)	55UM	2 (S)	70CL	4 (B)	83CF	3 (A)	98CG	1 (B)
38LP	1 (B)	56UM	3 (B)	71CL	5 (B)	84CF	9 (B)	99CG	1 (A)
39LP	4 (S)	57UM	1 (B)	72CL	2 (B)	85CF	1 (B)	100CG	1 (B)
40LP	3 (B)	58UM	3 (B)	73CL	3 (B)	86CF	3 (A)	101CG	6 (B)
41LP	7 (B)	59UM	3 (S)			87CF	1 (B)	102CG	1 (B)
42LP	2 (B)	60UM	1 (B)			88CF	2 (B)	103CG	1 (B)
43LP	26 (B)							104CG	1 (A)
44LP	2 (S)								
45LP	4 (B)								
Total	146		90		81		72		30

*(B): Aislados perteneciente al género *Bacillus*; (S): Aislados perteneciente al género *Staphylococcus*;

(A): Aislados perteneciente al género *Arthrobacter*

Todos los valores de densidad poblacional expresados x 10⁴ UFC.g⁻¹

La densidad total de individuos de este género en cada uno de estos cortes resultó menor que la del género *Bacillus*.

Su densidad poblacional mostró un ligero comportamiento hacia la disminución al ascender de un piso al otro. En las hojas del «Centro Fino» el número de individuos de las poblaciones de *Arthrobacter* fueron superiores a las de *Staphylococcus*.

CONCENTRACIÓN DE NICOTINA EN LOS DIFERENTES CORTES DEL TABACO CURADO PARA CAPAS

Al determinar la concentración de nicotina de las hojas de tabaco curado en las muestras tomadas de los diferentes pisos foliares se obtuvo que los valores medio de concentración de este alcaloide se incrementaron significativamente desde el corte «Libre pie» hasta el «Centro Gordo». Estos valores medio estuvieron entre el 1,26 % y el 4,02 %, respectivamente. Solo las medias de los cortes «Centro Ligero» y «Centro Fino» no se diferencian significativamente entre sí (Figura 1).

El rango de los valores de concentración de la nicotina obtenido en este estudio se encuentra dentro del margen que se ha informado para los cultivares de *N. tabacum* (8, 9, 10) y el significativo incremento de la concentración de nicotina desde los niveles foliares inferiores hasta los superiores en las hojas curadas es un hecho que ha sido descrito con anterioridad en varios tipos de tabaco (9, 26).

VALORES DE pH EN LOS DIFERENTES CORTES DEL TABACO CURADO PARA CAPAS

Al comparar los valores de pH obtenidos de las muestras de los diferentes pisos foliares del tabaco curado se pudo observar que las medias de estos valores no se diferencian significativamente entre sí. Los valores medios estuvieron entre 5,86 y 6,33 (Figura 1).

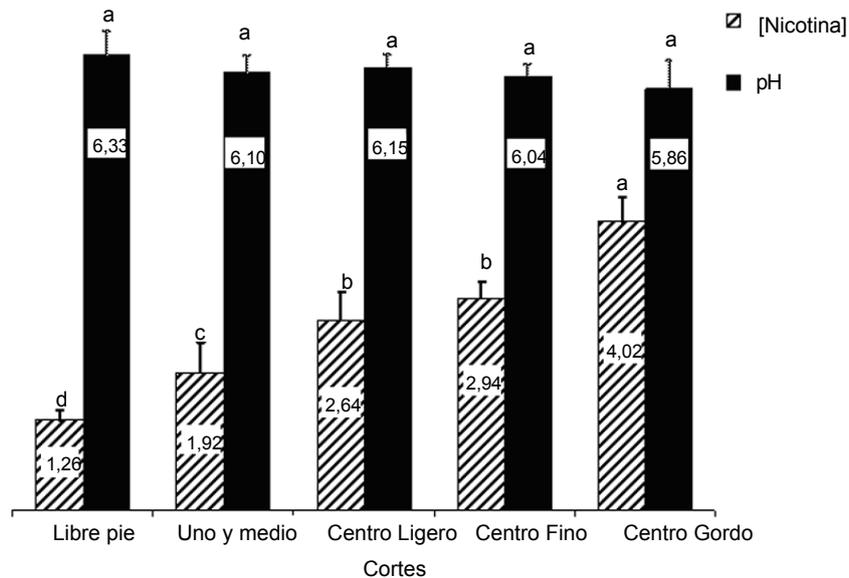
Se ha demostrado que por lo general la disminución del pH es ligera y continua desde la base hasta el ápice de la planta (27). Estos resultados son similares a los obtenidos en este estudio donde se apreciaron pequeñas variaciones en las medias de los valores de pH desde «Libre pie» hasta «Centro Gordo», las cuales no llegaron a ser significativas.

RELACIÓN DE LA NICOTINA Y EL pH DE LAS HOJAS DE TABACO DE CADA CORTE CON LA DENSIDAD DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS PRESENTE EN ELLOS

En el análisis con el modelo de regresión múltiple se obtuvo la ecuación de mejor ajuste del plano:

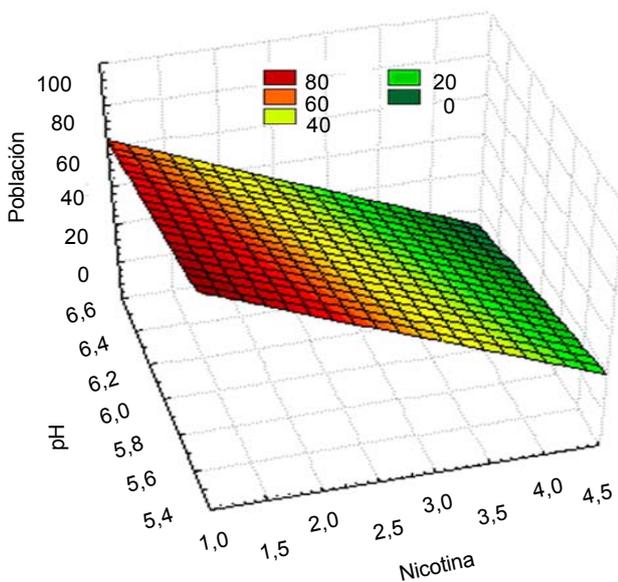
$$\text{Población} = 228,64 - 20,304*[\text{Nicotina}] - 22,048*[\text{pH}]$$

De la Figura 2 se puede deducir que las poblaciones bacterianas disminuyeron con el incremento de la concentración de nicotina en los cortes más que con la variación del pH.



Letras diferentes se corresponden con diferencias significativas en las medias de los valores (*p<0,05)
 Los números dentro de las barras indican la media de las determinaciones (n=6)

Figura 1. Resultados de los análisis de concentración de nicotina (%) y valores de pH realizados a las muestras de los diferentes cortes del tabaco curado para capas



Los valores de la población bacteriana están expresados x10⁴ UFC.g⁻¹

Figura 2. Plano de regresión de la variación de la densidad de población bacteriana ajustado por las medias de concentraciones de nicotina (%) y valores de pH

En la tabla del ANOVA (datos no mostrados) el valor P=0,0311, indicó que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables analizadas. El estadístico R² indicó que el modelo explica el 62,9 % de las variaciones en la población bacteriana.

El análisis independiente de las variables concentración de nicotina y pH permitió determinar que las variaciones en la concentración de nicotina explican

el 58,4 % de los cambios en la población bacteriana mientras que las variaciones del pH solo explican un 6,8 %. El mayor valor de P de las variables independientes pertenece al pH (0,3908), que al ser mayor que 0.1 indica que no es estadísticamente significativo (p<0,01) por lo que su aporte al modelo es mínimo y se puede prescindir de él. El análisis de multicolinealidad reveló que las variables concentración de nicotina y valor de pH son independientes.

La disminución continua de la densidad poblacional de la microbiota aislada de las hojas de tabaco curado para capa, observada desde la base al ápice de la planta, en estrecha relación con el incremento de la concentración de nicotina en este mismo sentido, pudiera estar indicando que la nicotina afecta el crecimiento de estos grupos microbianos.

Algunos estudios *in vitro* señalan que la nicotina afecta a ciertos grupos de bacterias al producir la disminución de sus poblaciones cuando se incrementa el contenido de este alcaloide en el medio de cultivo (11, 12).

Sobre este tema se han realizado pocas investigaciones y aún no se conoce de qué forma afecta la concentración de nicotina a los microorganismos. Parece ser que el efecto no tiene que ver con la genotoxicidad de esta sustancia ya que en pruebas con la bacteria *Salmonella typhimurium* (ex Kauffmann y Edwards) Le Minor y Popoff se encontró que la nicotina no tenía efecto genotóxico (28, 29), aunque en mamíferos sí se ha encontrado efecto genotóxico y citotóxico (30, 31, 32, 33, 34). En cultivo de células del gusano *Caenorhabditis elegans* Maupas, se encontró que el efecto genotóxico depende de la dosis de nicotina administrada (35).

El recobrado de aislados del género *Arthrobacter* en los pisos superiores se puede explicar por la existencia dentro de este género de especies que metabolizan la nicotina (36, 37) por lo que la competencia por el nicho ecológico pudiera favorecerlos.

Los resultados también muestran que los valores de pH de los diferentes cortes apenas afectaron a las poblaciones microbianas, lo que al parecer tiene que ver con el hecho de que el crecimiento óptimo de la mayoría de las bacterias es cercano a la neutralidad (13) y que los valores de pH dentro del rango estudiado apenas las afectan. En un estudio que involucró a aislados degradadores de la nicotina obtenidos de hojas de tabaco para tripas, dos de ellos pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Staphylococcus*, se obtuvo que en el rango de pH entre 5,8-7,8 hubo un adecuado crecimiento de estos dos aislados, siendo el pH de 6,8 el óptimo para su crecimiento (38).

Finalmente, aunque resulta fundamental la influencia de la concentración de la nicotina en la densidad poblacional bacteriana y esta de conjunto con los valores de pH permitan explicar cerca del 63 % del comportamiento de la población microbiana, no es despreciable la influencia de otros factores que, aunque no fueron tomados en cuenta, pudieran jugar un papel importante en la reducción de la densidad poblacional con el ascenso de los pisos foliares.

En este sentido se plantea, que los diferentes pisos foliares presentan una composición diferente de nutrientes y que hacia los pisos superiores se concentra la menor cantidad de sustancias nutritivas simples tales como los azúcares reductores (9, 10). La poca disponibilidad de estos componentes simples en los pisos foliares superiores, pudiera limitar el establecimiento y desarrollo de muchos grupos microbianos que carezcan de las capacidades metabólicas necesarias para utilizar los nutrientes más complejos.

CONCLUSIONES

- En el tabaco negro curado para capa desde el corte «Libre pie» hasta el «Centro Ligero» existe un predominio de las poblaciones de bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Staphylococcus*. En el corte «Centro Fino», además de los géneros citados, predominan bacterias de *Arthrobacter* spp., y en el corte «Centro Gordo» solo predominan *Bacillus* spp. y *Arthrobacter* spp. En todos los estratos foliares la población total de *Bacillus* spp siempre superó a las poblaciones totales de los otros géneros predominantes.
- La disminución continua de la densidad poblacional total de la microbiota aislada de las hojas de tabaco curadas desde el corte «Libre pie» hasta el «Centro Gordo» está en estrecha relación con el incremento de la concentración de nicotina que se observa al ascender por los diferentes estratos foliares.

- Los resultados mostraron que la variación del pH de las hojas de los diferentes estratos foliares no influyó en la disminución de la microbiota.

REFERENCIAS

1. Valladares, R. Instructivo para el acopio y beneficio del tabaco negro tapado. 1ra Edición. La Habana: Agrinfor, 2003. p. 59. ISBN 959-246-067-1.
2. Domínguez, R. y Morán, Y. El papel de los microorganismos en el proceso fermentativo del tabaco. *Cuba Tabaco*, 2011, vol. 12, no. 1, p. 63-69.
3. Di Giacomo, M.; Paolino, M.; Silvestro, D.; Vigliotta, G.; Imperi, F.; Visca, P.; Alifano, P. y Parente, D. Microbial community structure and dynamics of dark fire-cured tobacco fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, vol. 73, no. 3, p. 3825-3837.
4. Zhao, M.; Wang, B.; Li, F.; Qiu, L.; Li, F.; Wang, S. y Cui, J. Analysis of bacterial communities on aging flue-cured tobacco leaves by 16S rDNA PCR-DGGE technology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, vol. 73, no. 6, p. 1435-1440.
5. Morán, Y.; Domínguez, R.; Rivera, O.; Guardiola, J.; Díaz, A.; Carballo, R.; Márquez, I.; Morejón, O.; González, M.; Cuervo, M. y Hernández, F. Dinámica de la microbiota bacteriana en la fermentación en pilones de tabaco negro planchado, clase 15a ligero. *Cuba Tabaco*, 2009, vol. 10, no. 1, p. 41-56.
6. Huang, J.; Yang, J.; Duan, Y.; Gu, W.; Gong, X.; Zhe, W.; Su, C. y Zhang, K. Bacterial diversities on unaged and aging flue-cured tobacco leaves estimated by 16S rRNA sequence analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, vol. 88, no. 2, p. 553-562.
7. Su, C.; Gu, W.; Zhe, W.; Zhang, K.; Duan, Y. y Yang, J. Diversity and phylogeny of bacteria on Zimbabwe tobacco leaves estimated by 16S rRNA sequence analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, vol. 92, no. 5, p. 1033-1044.
8. Djordjevic, M. y Doran, K. Nicotine content and delivery across tobacco products. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2009, vol. 192, p. 61-82.
9. Tassew, Z. Levels of nicotine in Ethiopian tobacco leaves. University, Addis Ababa, 2007. p. 67.
10. Amirhandeh, M.; Nosratabad, A.; Norouzi, M. y Harutyunyan, S. Response of Coker (flue-cured) tobacco (*Nicotiana tabacum*) to inoculation with *Azotobacter chroococcum* at various levels of nitrogen fertilization. *Australian Journal of Crop Science*, 2012, vol. 6, no. 5, p. 861-868.
11. Pavia, C.; Pierre, A. y Nowakowski, J. Antimicrobial activity of nicotine against a spectrum of bacterial and fungal pathogens. *J. Med. Microbiol.*, 2000, vol. 49, no. 7, p. 675-676.
12. Baek, O.; Zhu, W.; Kim, H. y Lee, S. Effects of nicotine on the growth and protein expression of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Microbiol.*, 2012, vol. 50, no. 1, p. 143-148.
13. Madigan, M.; Martinko, J.; Dunlap, P. y Clark, D. Brock. *Biology of Microorganisms*. 12th Edition. San Fransisco, CA : Pearson Benjamin Cummings, 2009. 1061 p.
14. Harrigan, W. y McCance, M. Métodos de laboratorio en Microbiología. 1^{ra} Edición. Madrid, España: Academia, 1968. p. 22-23.

15. Pazos, V. y Casadesús, L. Métodos básicos de Microbiología. 1^{ra} Ed. La Habana: Andre Voisin, 1990. p. 39.
16. CORESTA. CORESTA recommended method no. 20. Determination of alkaloids in manufactured tobacco. http://www.coresta.org/recommended_methos/crm_20.pdf. 1968.
17. CORESTA. CORESTA recommended method no. 69. Determination of pH of smokeless tobacco products. http://www.coresta.org/recommended_methos/crm_69.pdf. 2010.
18. GraphPad Software, Inc. GraphPad InStat version 3.06. San Diego California USA, 2003. <http://www.graphpad.com/instat>
19. StatSoft. Statistic version 9.0. Tulsa, Oklahoma. USA, 2009. Disponible en: <<http://www.statsoft.com>>.
20. Claus, D. y Berkeley, R. Genus *Bacillus* Cohn 1872. En: Sneath P, Mair N, Sharpe M, Holt J, eds. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, Williams y Wilkins, Baltimore, 1986, vol. 2, p. 1105-1139.
21. Schleifer, K. Gram-Positive cocci. In: Sneath P, Mair N, Sharpe M, Holt, J. (Eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore, 1986, vol. 2, p. 999-1103.
22. Jones, D. y Collins, M. Irregular, non-sporulating Gram-positive rods. In Sneath P, Mair N, Sharpe M, Holt, J. (Eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore, 1986, vol. 2, p. 1261-1434.
23. Madruga, R. Presencia de microorganismos termófilos en las hojas de Vuelta Abajo durante el proceso de fermentación. *CubaTabaco*, 1979, vol. 5, no. 2, p. 130-137.
24. Suárez, C.; Martínez, J. y Fernández, I. Identificación de la microbiota bacteriana del tabaco negro variedad 'Criollo'. *Revista Biología*, 1990, vol. 4, no. 2, p. 179-191.
25. Espino, E. Guía para el cultivo del tabaco 2009-2010. La Habana: Agrinfor. 2009, p. 64.
26. Burton, H.; Dye, N. y Bush, L. Distribution of tobacco constituents in tobacco leaf tissue, *J. Agric. Food Chem.*, 1992, no. 40, p. 1050-1055.
27. Akehurst, B. El Tabaco: Agricultura Tropical. La Habana. Instituto del Libro, 1973. p. 682.
28. Yim, S. y Hee, S. Bacterial mutagenicity of some tobacco aromatic nitrogen bases and their mixtures. *Mutat. Res.*, 2001, no. 492, p. 13-27.
29. Doolittle, D.; Winegar, R.; Lee, C.; Caldwell, W.; Hayes, A. y de Bethizy, J. The genotoxic potential of nicotine and its major metabolites. *Mutat. Res.*, 1995, no. 344, p. 95-102.
30. Attia, S. The genotoxic and cytotoxic effects of nicotine in the mouse bone marrow. *Mutation Research*, 2007, no. 632, p. 29-36.
31. Demirhan, O.; Demir, C.; Tunç, E.; Ýnandýklyođlu, N.; Sütçü, E.; Sadykođlu, N. y Özcan B. The genotoxic effect of nicotine on chromosomes of human fetal cells: The first report described as an important study. *Inhalation Toxicology*, 2011, vol. 23, no. 13, p. 829-834.
32. Ginzkeya, C.; Kampfinger, K.; Friehsa, G.; Köhlera, C.; Hagen, R.; Richter, E. y Kleinsassera, N. Nicotine induces DNA damage in human salivary glands. *Toxicology Letters*. 2009, vol. 184, no. 1, p. 1-4.
33. Ginzkeya, C.; Friehsa, G.; Koehler, C.; Hackenberg, S.; Voelker, H.; Richter, E. y Kleinsassera, N. Nicotine and methyl methane sulfonate in mini organ cultures of human parotid gland tissue. *Toxicology Letters*, 2010, vol. 197, no. 2, p. 69-74.
34. Shanmugavelu, M.; Adluri, S.; Namasivayam, N. y Venugopal, M. Effect of quercetin on nicotine-induced biochemical changes and DNA damage in rat peripheral blood lymphocytes. *Redox Report.*, 2008, vol. 13, no. 5, p. 217-224.
35. Sobkowiak, R. y Lesicki, A. Genotoxicity of nicotine in cell culture of *Caenorhabditis elegans* evaluated by the comet assay. *Drug and Chemical Toxicology*, 2009, vol. 32, no. 3, p. 252-257.
36. Ganas, P.; Igloi, G. y Brandsch, R. The megaplasmid pAO1 of *Arthrobacter Nicotinovorans* and nicotine catabolism. *Microbiology Monographs*, 2009, no. 11, p. 271-282.
37. Ganas, P.; Sachelaru, P.; Mihasan, M.; Igloi, G. y Brandsch, R. Two closely related pathways of nicotine catabolism in *Arthrobacter nicotinovorans* and *Nocardioides* sp. strain JS614. *Archives of Microbiology*, 2008, vol. 189, no. 5, p. 511-517.
38. Domínguez, R.; Morán, Y.; Fajardo, D.; Carballo, R.; Márquez, I.; Morejón, O. y Lobo, J. Método para la cuantificación de la capacidad biodegradativa de la nicotina por bacterias en cultivo discontinuo. *CubaTabaco*, 2011, vol. 12, no. 2, p. 45-55.

Recibido: 2 de mayo de 2012

Aceptado: 26 de noviembre de 2012

¿Cómo citar?

Morán Gómez, Yuniór M.; Fleitas Gutiérrez, Daylin; Domínguez Larrinaga, Rosario; Cuervo Fernández, Martín M.; Guardiola Pedroso, José M. y Márquez Leyva, Isabel. Géneros bacterianos dominantes en los estratos foliares del tabaco curado para capas. Influencia de la nicotina y el pH sobre su densidad poblacional. *Cultivos Tropicales*, 2013, vol. 34, no. 3, p. 17-24.