

2017 International Symposium on Cocoa Research (ISCR), Lima, Peru, 13-17 November 2017,

Caracterización de la comunidad microbiana cultivable presente en suelos cacaoteros en una zona productora de Colombia, como contribución al manejo de la fertilidad del suelo.

H. A. Cordoba^{1,2}, P. Bermeo^{1,3}, E. Torres^{1,4}

¹Laboratorio de Agrobiotecnología. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia;

²Estudiante de Ingeniería Agronómica hacordoban@unal.edu.co; ³Ingeniera Agrónoma pabermeof@unal.edu.co; ⁴Profesora asociada, PhD. etorresr@unal.edu.co

Resumen

En Colombia, el cultivo de Cacao (*Theobroma cacao*) tiene un alto potencial agronómico. Sin embargo, presenta una baja productividad como resultado, en parte, a un manejo ineficiente de la fertilización. Programas de fertilización fundamentados en los requerimientos nutricionales del cultivo, en el conocimiento del papel que cumple la comunidad microbiana en el ciclaje de nutrientes y del efecto que causa la fertilización sobre esta comunidad, permitirá contar con planes de fertilización más efectivos que aumentarían la productividad del cultivo de manera sostenible. Este proyecto tiene como objetivo realizar la caracterización morfológica y molecular de la comunidad microbiana cultivable asociada a la degradación de celulosa, solubilización de fosfatos (fosfato tricálcico, de hierro y aluminio) y fijación de nitrógeno libre en suelos y compost presentes en dos fincas cacaoteras ubicadas en el municipio de Nilo, Cundinamarca. Para ello, se colectaron muestras compuestas de suelo rizosférico de plantas de cacao provenientes de una finca con fertilización convencional o química y otra orgánica. Se determinó el logUFC por gramo seco de suelo como medida indirecta de la abundancia de microorganismos encontrada en cada muestra; se aisló y caracterizó los morfotipos aislados de bacterias y hongos encontrados en medios selectivos y se determinó su actividad enzimática cualitativa celulolítica y solubilizadora de fosfatos. La identificación molecular fue llevada a cabo para los morfotipos de bacterias y hongos que presentaron mayor potencialidad usando el marcador 16S e ITS1-4 del gen rADN, respectivamente. Se encontró que la abundancia de bacterias celulolíticas y hongos solubilizadores de fosfatos fue mayor en el suelo con manejo orgánico y el compost presentó la mayor diversidad y abundancia de microorganismos celulolíticos. Del total de 63 hongos con potencial de degradación de celulosa, *Fusarium* sp. obtuvo el mejor resultado con un factor de hidrólisis de 2.3. De un total de 38 hongos potenciales solubilizadores de fósforo, *Ustilaginpoidea* sp., presentó el mejor resultado con factor de solubilización en fosfato tricálcico de 1.5. Respecto a bacterias fijadoras de nitrógeno, la abundancia de morfotipos fue mayor en la finca orgánica, aunque sin diferencias significativas, siendo el género *Bacillus* sp. el potencial fijador. Este estudio permite resaltar el papel de la microbiota nativa en el ciclaje de carbono, fósforo y

nitrógeno, así como su contribución a la fertilidad natural de suelos cacaoteros y la productividad del cultivo.

Introducción

Colombia es un país agrícola donde el cultivo de cacao presenta niveles bajos de productividad (56.785 Ton) (FEDECACAO, 2016) comparado con países como Ecuador, Brasil y Costa de Marfil (FAO, 2016). Una alternativa para obtener una alta productividad en el cultivo es contar con un adecuado plan de fertilización que contemple los nutrientes que son requeridos por el cultivo, que evite el uso indiscriminado de insumos de síntesis química, tenga menor impacto negativo en los agroecosistemas (Kumar, Maurya, & Raghuwanshi, 2014) y genere una actividad agrícola sostenible. A pesar de que la comunidad microbiana del suelo cumple un papel esencial en el ciclaje de nutrientes (Mocali & Benedetti, 2010; Avellaneda & Torres, 2014; Uribe-Velez & Melgarejo, 2014), se desconoce su papel en la regulación de los ciclos geoquímicos como el carbono (C), nitrógeno (N) y fósforo (P), entre otros. Adicionalmente, son pocos los estudios sobre el efecto que tiene el tipo de fertilización convencional (química) u orgánica sobre la estructura y funcionalidad de la comunidad biótica asociada al cultivo del cacao. Este trabajo busca identificar y caracterizar los microorganismos nativos cultivables con potencial para degradar celulosa, fijar nitrógeno y solubilizar fosfatos presentes en suelos cacaoteros bajo fertilización convencional y orgánica del municipio de Nilo-Cundinamarca-Colombia, como contribución al manejo de la fertilidad del suelo. Esta investigación hace parte del proyecto de Mejoramiento de la productividad de cacao en las provincias de Rionegro y Alto Magdalena, el cual hace parte del derivado No. 2 del Convenio Marco 395 de 2012, en donde participan las siguientes entidades Universidad Nacional de Colombia, Alcaldía Mayor de Cundinamarca, Gobernación de Cundinamarca, CORPOICA y FEDECACAO.

Materiales y métodos

Muestreo de suelos, hojarasca y de compost

El lugar de estudio se ubicó en el municipio de Nilo – Cundinamarca, Colombia (Figura 1). Se realizó el muestreo en dos fincas contrastantes por el tipo de fertilización empleada: convencional y orgánica con certificación BCS ÖKO GARANTIE COLOMBIA S.A.S. La selección de los puntos fue realizada en Qgis® utilizando el método de cuadrícula a partir del perímetro de cada uno de los suelos. En total se tomaron 15 submuestras para la finca convencional y 20 submuestras para la finca orgánica y cada submuestra correspondió a un árbol de cacao, en el cual, se tomaron cuatro muestras de suelo equidistantes entre sí y alejadas a 30 cm de la base del árbol; las muestras de suelo fueron tomadas a una profundidad de 15 cm. Adicionalmente, fue tomada una muestra

de compost que contenía residuos de plátano (*Musa acuminata*), banano (*Musa paradisiaca*) y mango (*Mangifera indica*), los cuales provenían del sistema de producción orgánico.

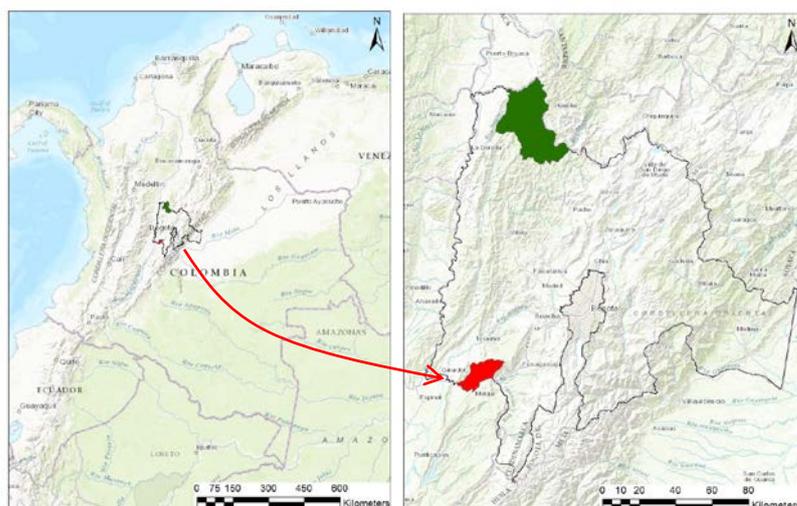


Figura 1. Localización del estudio realizado. Municipio de Nilo, departamento de Cundinamarca, Colombia.

Aislamiento microbiológico en medios selectivos y preservación

Se realizó la dilución seriada de los suelos en medios selectivos, siguiendo la metodología reportada por Avellaneda & Torres (2014) con algunas modificaciones: Para microorganismos degradadores de celulosa fue utilizado el medio CMC; para bacterias fijadoras de nitrógeno, se utilizó el medio de Rennie y para microorganismos solubilizadores de fosfato se utilizó el medio de cultivo SMRS. Los medios selectivos utilizados para las bacterias y hongos se incubaron a 37°C por 48 horas y a temperatura ambiente de 5 - 7 días, respectivamente, y luego se determinó el Número de Unidades formadoras de Colonias (UFC). Se utilizaron tres réplicas por dilución y tipo de medio selectivo. Finalmente, se realizó el aislamiento, purificación y preservación de los morfotipos.

Identificación y caracterización de morfotipos

La caracterización macroscópica de bacterias se realizó con base en tamaño, color, forma, borde, superficie, elevación, luz reflejada y consistencia de la colonia y la caracterización microscópica a partir de tinción de Gram. Para el caso de hongos, las características macroscópicas fueron el color del micelio (pigmentación), aspecto y generación de pigmentos difusibles. Las características microscópicas de los hongos fueron realizadas mediante el uso de improntas y microcultivos.

Prueba de Rojo Congo, solubilización de fosfatos y evaluación de fijación de nitrógeno

Con el fin de evaluar el potencial de degradación de celulosa, fue realizada la prueba de Rojo Congo de acuerdo a lo reportado por Moya & Torres (2012). El potencial de solubilización de fosfatos fue evaluado en aquellos hongos y bacterias que presentaron un halo de solubilización en medio SMRS. Esta última prueba fue realizada utilizando tres fuentes de fósforo de manera independiente: i) Fosfato tricálcico [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$], ii) Fosfato de hierro [FePO_4] y iii) fosfato de aluminio [AlPO_4], estas fuentes fueron adicionadas en el medio de cultivo SMRS a una concentración de $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de medio. Los factores de solubilización se determinaron midiendo los diámetros de halo y colonia [diámetro del halo de hidrólisis (cm)/diámetro de la colonia (cm)].

La habilidad fijadora de nitrógeno atmosférico fue determinada en bacterias a través del uso del medio Rennie, carente de cualquier fuente de dicho elemento. El viraje del medio de verde a azul fue el indicador de la potencialidad de la fijación del nitrógeno.

Análisis estadístico

Fueron realizados análisis descriptivos y análisis de varianza (ANOVA). El análisis descriptivo incluyó boxplot para los microorganismos con potencial celulolítico e involucrados en la solubilización de fosfatos. En ANOVA se realizó bajo un diseño factorial con el tipo de finca, ciclo biogeoquímico y tres repeticiones. Se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$) para la comparación entre medias de los tratamientos resultantes de la combinación de factores.

Resultados y discusión

Abundancia de morfotipos aislados

En relación al factor sustrato, la abundancia total de hongos y bacterias no fue significativamente diferente. Al respecto, Aon et al. (2001), mencionan que muchas labores de manejo agronómico pueden no afectar significativamente la estructura microbiana presente en diferentes sistemas de cultivo. La abundancia de bacterias celulolíticas y hongos solubilizadores de fosfatos y degradadores de celulosa fue significativamente mayor en la finca orgánica y el compost respecto al suelo de manejo convencional (Figura 2). En el caso de la actividad celulolítica, los resultados son atribuidos a la composición de suelos con manejo orgánico y de materiales de compost, en donde la proporción e incorporación de materiales fibricos y hémicos es mayor en relación a la de un suelo con manejo convencional y por tanto los sustratos de degradación son más abundantes.

En los suelos bajo fertilización convencional, la abundancia de hongos solubilizadores de fosfatos fue significativamente menor a la del suelo con fertilización orgánica y compost. Beauregard et

al. (2010) encontraron que la adición de fertilizantes influyen la composición de bacterias y hongos por el impacto que tienen en el corto y largo plazo sobre el ambiente del suelo.

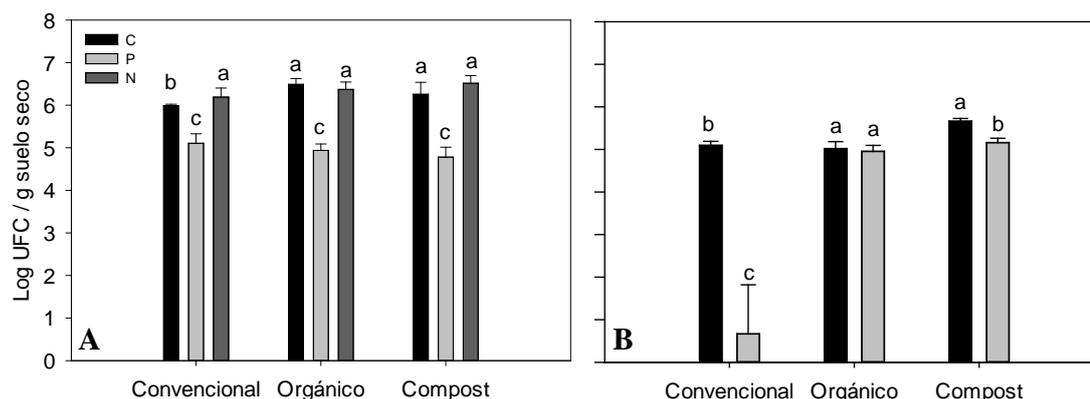


Figura 2. Abundancia de morfotipos de microorganismos en diferentes sustratos evaluados en fincas cacaoteras del municipio de Nilo (Cundinamarca-Colombia) bajo fertilización convencional (química) y orgánica. A corresponde a bacterias y B a hongos. Microorganismos asociados al ciclo biogeoquímico C, carbono; N, nitrógeno; P, fósforo. Medias con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Microorganismos asociados a la degradación de celulosa, rojo Congo y solubilización de fosfatos
 Del total de morfotipos aislados, el 91% correspondieron a hongos, lo que indica que la función de degradación de celulosa en los diferentes suelos y materiales evaluados está mayormente relacionada con los hongos. Con respecto a la prueba de rojo congo, la figura 3 muestra el resultado del factor de hidrólisis en donde se presentó un mayor número de morfotipos en el compost en comparación con los dos tipos de suelo. Además, en este material se evidenció el morfotipo con el mayor factor de hidrólisis (2.3) correspondiente a *Ustilagoideia* sp. El género predominante asociado a este tipo de degradación en la zona estudiada fue *Fusarium* spp. con un 11.97% de participación. De otro lado, la muestra de compost presentó especies de los géneros *Sepedonium*, *Aspergillus* y *Ustilagoideia* que no fueron encontrados en los otros dos materiales evaluados. Esto muestra que, dependiendo del material de origen, la proporción, tipo y cantidad de microorganismos cambia.

De este modo, se observa que el nicho de este tipo de microorganismos se encuentra en la muestra de compost. Un estudio realizado por Avellaneda-Torres, Guevara Pulido, & Torres (2014), muestra la correlación que existe entre la prueba de rojo Congo con la actividad enzimática de los hongos degradadores de celulosa.

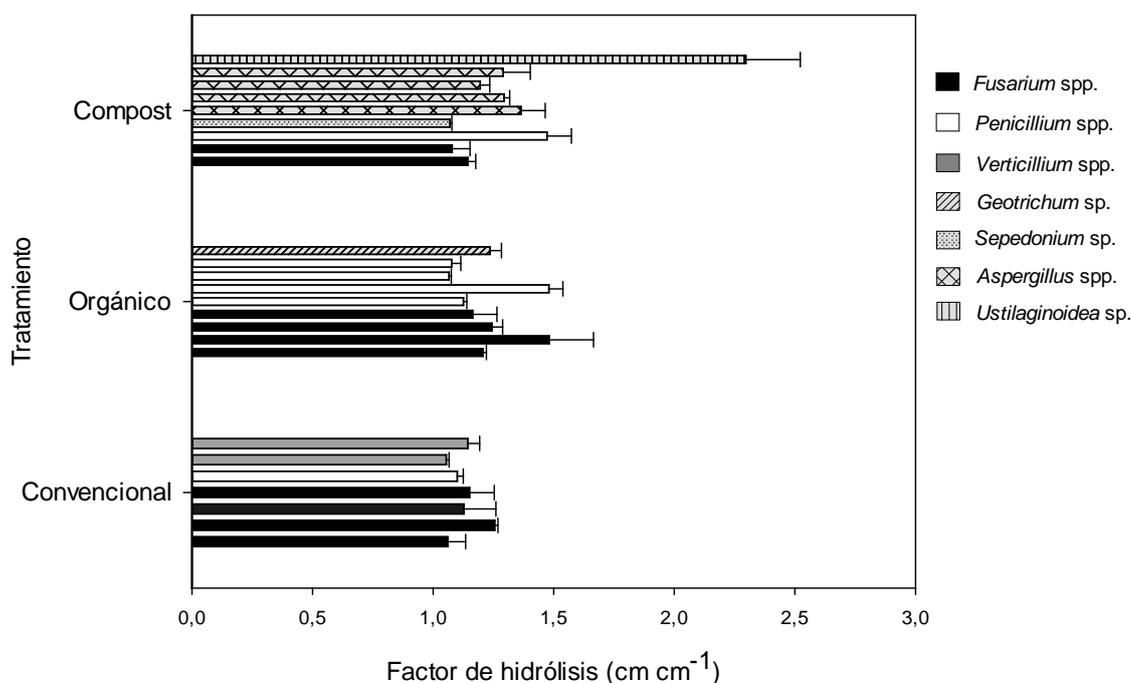


Figura 3. Factor de hidrólisis de hongos evaluados en compost, suelo de un sistema orgánico y uno convencional. Las barras de error indican

De otro lado, en el suelo, el fósforo puede formar complejos estables con el aluminio, hierro o calcio. Las formas predominantes varían de acuerdo a las características químicas del mismo como pH, la capacidad de intercambio catiónico, entre otras; en suelos con pH ácido predominan los fosfatos de hierro y aluminio y en pH altos los fosfatos de calcio (Park et al., 2010; Stevenson & Cole, 1999). En este sentido, la prueba con diferentes fuentes permite evidenciar la capacidad de los hongos aislados para solubilizar diferentes fuentes de fósforo (Figura 4).

En el suelo convencional, *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.* y *Verticillium sp.* evidenciaron solubilización de las fuentes de fósforo acomplejadas con calcio y aluminio. Uno de los morfotipos aislados del género *Aspergillus spp.* y *Fusarium sp.* mostraron solubilización de fosfatos de hierro, siendo potenciales en suelos con la predominancia de estas fuentes de fósforo.

En el compost, *Penicillium sp.* mostró solubilización únicamente de la fuente de fosfato de calcio y en el suelo del sistema productivo orgánico *Penicillium spp.* y *Aspergillus sp.* exhibieron una solubilización de fosfatos de calcio y de aluminio. Debido a las condiciones ácidas de los suelos estudiados (pH 4.53 y 5,87 para suelos con manejo orgánico y convencional, respectivamente) los hongos de los géneros *Penicillium spp.* y *Aspergillus sp* resultan ser de importancia en términos de solubilización en esta región.

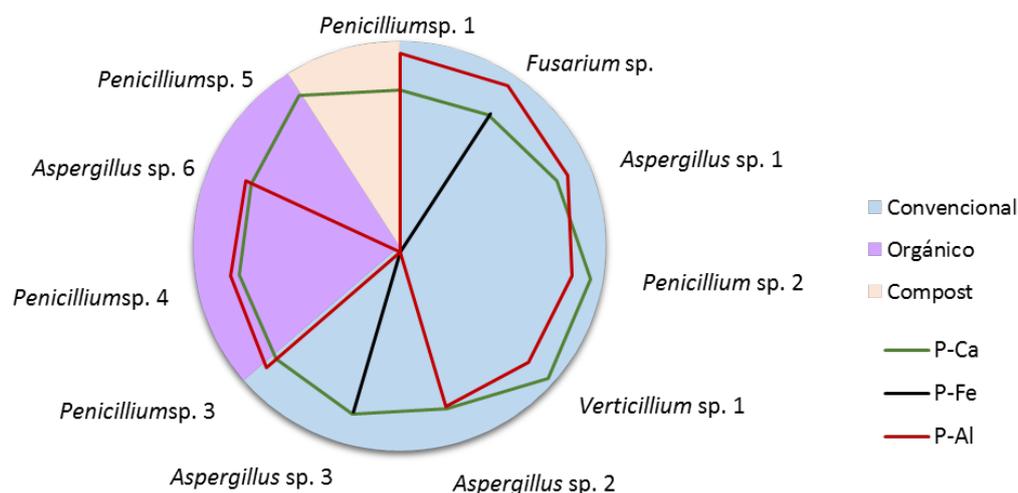


Figura 4. Solubilización de fosfatos de calcio, hierro y aluminio en morfotipos de hongos aislados a partir de suelo con manejo convencional, orgánico y compost.

Conclusiones

El cultivo de cacao alberga una comunidad de microorganismos benéfica en suelo asociada a degradación de celulosa, solubilización de fosfatos y fijación de nitrógeno. En sustratos como el compost se encuentra hongos con potencial en la degradación de celulosa y la solubilización de fosfatos que pueden ser utilizados en programas de biofertilización para el cultivo de cacao. *Ustilaginoidea* sp. aislado a partir de compost tiene un alto potencial de degradación de celulosa y *Fusarium* sp. proveniente del suelo con manejo convencional un alto potencial de degradación de fosfatos de calcio, hierro y aluminio.

Agradecimientos

Los autores agradecen de manera especial a los agricultores del municipio de Nilo por su inmensa colaboración y a los integrantes y financiadores del proyecto No. 2 del Convenio Marco 395 de 2012.

Bibliografía

- Aon, M., Cabello, M., Sarena, D., Colareni, A., Franco, M., Burgos, J. ., & Cortassa, S. (2001). I. Spatio-temporal patterns of soil microbial and enzymatic activities in an agricultural soil. *Applied Soil Ecology*, 18(3), 239–254. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(01\)00153-6](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(01)00153-6)
- Avellaneda-Torres, L. M., Guevara Pulido, C. P., & Rojas, E. T. (2014). Assessment of cellulolytic microorganisms in soils of Nevados Park, Colombia. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(4), 9.

- Avellaneda, L. M. (2014). *Caracterización de comunidades microbianas asociadas a prácticas agrícolas y usos del suelo de la vereda El Bosque - Parque Nacional Natural de los Nevados*. Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá.
- Beauregard, M. S., Hamel, C., Atul-Nayyar, & St-Arnaud, M. (2010). Long-term phosphorus fertilization impacts soil fungal and bacterial diversity but not AM fungal community in alfalfa. *Microbial Ecology*, 59(2), 379–389. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9583-z>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO. (2016). FAOSTAT.
- Kumar, A., Maurya, B. R., & Raghuwanshi, R. (2014). Isolation and characterization of PGPR and their effect on growth, yield and nutrient content in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.08.003>
- Moya A., L. A., & Torres R., E. (2012). Hydrolysis of cellulose and oil palm empty fruit bunches by using consortia of fungi isolated from the soil of Colombian high andean forest. *Soils, Fertilization and Management of Water*, 30(3), 411–418.
- Park, K.-H., Lee, O.-M., Jung, H.-I., Jeong, J.-H., Jeon, Y.-D., Hwang, D.-Y., ... Son, H.-J. (2010). Rapid solubilization of insoluble phosphate by a novel environmental stress-tolerant *Burkholderia vietnamiensis* M6 isolated from ginseng rhizospheric soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(3), 947–955. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2388-7>
- Stevenson, F. J., & Cole, M. (1999). *Cycles of soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients*. Wiley.