



## **MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DEL CACAO (*Theobroma cacao* L) EN CONDICIONES DE BOSQUE HÚMEDO PREMONTANO (Bh-PM).**

Edna Leiva ✉, Mónica Osorio, Ramiro Ramírez

Universidad Nacional de  
Colombia. Sede Medellín  
✉: eileiva@unal.edu.co

### **RESUMEN**

*La producción de cacao en Colombia incluye en pocas ocasiones la fertilización orgánica o inorgánica, ya que se considera que este sistema de producción es autosostenible, gracias al aporte periódico de materiales orgánicos como la hojarasca presente en los cacaotales, que facilita el mantenimiento y enriquecimiento de la microbiota del suelo. En esta investigación se colectaron muestras de suelo rizosférico y raicillas en cacaotales de la Granja Luker, con coordenadas 5°04'14.13" N y 75° 41'07.15" O y una altitud de 1033m, en zona de vida Bosque Húmedo Premontano (Bh-PM). Se extrajeron los microorganismos por siembra directa y mediante agitación. Se separaron las bacterias y los hongos por morfotipos, se purificaron y se determinó su grupo funcional: solubilizadores de fosfato, fijadores de nitrógeno, proteolíticos, celulolíticos y amilolíticos. En estos suelos volcánicos se aislaron en total 26 morfotipos de bacterias y 12 de hongos; el 45% de los morfotipos de bacterias aislados presentó actividad fijadora de nitrógeno o solubilizadora de fosfatos; los hongos presentaron baja actividad funcional, solo dos cepas con capacidad amilolítica, cuatro proteolítica y solo uno con actividad solubilizadora de fosfatos.*

### **Palabras clave:**

solubilizadores de fosfatos,  
fijadores de nitrógeno,  
proteolíticos, celulolíticos,  
amilolíticos.

## **EFFECT OF THREE SYSTEMS OF INCORPORATION OF DOLOMITE LIMESTONE IN THE COLOMBIAN FLAT PLAINS.**

### **ABSTRACT**

*The cocoa production in Colombia includes rarely organic or inorganic fertilizer because it is considered that this production system is self-sustaining, thanks to permanent contribution of organic matter constituted mainly by litter caused by the cocoa crop. It facilitates the adoption of efficient practices for the maintenance and enhancement of soil microbiota. In this research, soil samples were collected rhizosphere and rootlets in cacao crop at Farm Luker with coordinates 5° 04' 14.13" N and 75 ° 41' 07.15" W, an altitude of 1033m, and in wet forest Premontane (wf-PM) life zone. The Microorganisms were extracted by direct seeding and by shaking of surrounding soil (rhizosphere). Bacteria and fungi were separated by morphotypes, purified and tested for their functional group: phosphate solubilizing, nitrogen-fixing, proteolytic, amyolytic and cellulolytic. Under these conditions volcanic soil 26 morphotypes fungi and 12 bacteria were isolated in total. 45% of the isolated bacterial morphotypes showed nitrogen-fixing activity and / or solubilizing phosphates. The fungi showed low functional activity, only two strains with amyolytic capacity accommodate, four with proteolytic and only one with phosphate solubilizing activity.*

**Key words:** rhizosphere,  
phosphate solubilizing,  
nitrogen-fixing, proteolytic,  
amyolytic

**SUELOS  
ECUATORIALES**  
43 (1): 35-45

ISSN 0562-5351

## INTRODUCCIÓN

Las prácticas agronómicas utilizadas en plantaciones de *Theobroma cacao* L., incluyen en algunas ocasiones la fertilización orgánica y con mayor frecuencia la aplicación de fertilizantes de síntesis, con el propósito de incrementar la producción de grano y disminuir el ataque de patógenos; desconociendo o subestimando el componente biológico. La agricultura sostenible y eficiente debe incluir el mantenimiento y enriquecimiento de la microbiota del suelo, ya que esta participa en el ciclado de los nutrientes y de la materia orgánica.

En las plantaciones de cacao es posible la implementación de una agricultura sostenible, en donde parte de la clave para la productividad, está en el mantenimiento de los niveles de materia orgánica del suelo y el ciclaje de nutrientes. El aporte periódico de materiales orgánicos constituido principalmente por la hojarasca, común en los cacaotales, facilita la adopción de prácticas sostenibles en este sistema productivo. Según Blair *et al.* (1995), el contenido de materia orgánica del suelo es un equilibrio entre la adición y la tasa de descomposición y como tal, modificaciones en las prácticas agrícolas pueden dar lugar a incremento del carbono, de los nutrientes y por tanto mejoras de la calidad del suelo agrícola.

La materia orgánica del suelo favorece el desarrollo de la agregación y su estructura, influyendo en la dinámica hídrica y en las transformaciones de sus componentes que representan modificaciones del medio edáfico y benefician a las plantas. Es importante considerar que la materia orgánica es el principal factor que incide en las características del sistema raíz-suelo y representa una de las diferencias sobresalientes entre el suelo rizosférico y no rizosférico (Pozuelo-González, 1991).

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un árbol originario de las selvas neotropicales, principalmente de la cuenca del Amazonas y la meseta Guyanesa (Lachenaud *et al.*, 2007), que en el país ha tomado importancia debido a la gran demanda que existe en el mundo de su producto principal, el chocolate y de sus demás derivados. Los suelos cacaoteros presentan una vasta reserva de poblaciones microbianas endofíticas (Arnold y Herre, 2003), que favorecen los procesos de asimilación de nutrientes.

Es ampliamente mencionado en la literatura el beneficio del uso de los microorganismos en la

producción agrícola (Hofmockel *et al.*, 2010; Leungvutiviroj *et al.*, 2010; Hu y Qi, 2013), en cacao se reportan trabajos que resaltan su actividad como favorecedores de la nutrición de las plantas (López *et al.*, 2007), sin embargo, son pocos los estudios de la rizosfera en este cultivo que relacionen microorganismos diferentes a las micorrizas.

El uso de fertilizantes agrícolas ha modificado las condiciones edáficas y ha provocado, entre otras, la disminución de la actividad microbiana comprometida en el proceso de nutrición (Lara-Mantilla *et al.*, 2007). Los efectos en el ambiente y los costos de los insumos químicos, han incrementado el interés por conocer otras alternativas que permitan disminuir el empleo de agroquímicos, es por esto que cada día son más importantes los trabajos encaminados a conocer la función de los microorganismos en el suelo y su relación con la rizosfera.

La función de los microorganismos en el suelo, especialmente la de algunos grupos definidos, puede ser empleada para permitir que determinadas actividades microbianas se expresen de forma eficaz, de allí que pueden jugar un papel preponderante como indicadores de la calidad y salud del suelo (Acuña *et al.*, 2006), además, de contribuir a la nutrición y al ciclaje de nutrientes.

Los microorganismos que colonizan la rizosfera pueden afectar el crecimiento de la planta positiva o negativamente. Las rizobacterias pueden estimular el crecimiento de las plantas, impactar la biología de la raíz, la nutrición y ayudar a la sostenibilidad a largo plazo (Karagöz *et al.*, 2012). La promoción del crecimiento de las plantas puede ser a través de al menos uno de los siguientes mecanismo: suprimir enfermedades (bioprotectores), mejorar la toma de nutrientes (biofertilizantes) o influir en la producción de fitohormonas (bioestimulantes) (Martínez-Viveros *et al.*, 2010; Saharan y Nehra, 2011).

Uno de los mayores beneficios de los microorganismos, es su capacidad para facilitar la disponibilidad de nitrógeno en el suelo mediante la fijación biológica (Baca *et al.*, 2000), además, se les atribuyen otras cualidades entre las que se destacan la solubilización de nutrientes que los hace disponibles para las plantas (Yazdani *et al.*, 2009).

Estos microorganismos, en especial las bacterias, que frecuentemente son utilizadas como biofertilizantes, son más efectivas al ser aisladas de la rizosfera sin tener modificaciones genéticas

(Wedhastri *et al.*, 2012). El propósito de esta investigación fue evaluar los microorganismos asociados a la rizosfera del cacao en condiciones de bosque húmedo premontano (Bh-PM), cultivables bajo condiciones de laboratorio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de suelo fueron obtenidas de la Granja Luker, ubicada en el municipio de Palestina (Caldas) con coordenadas 5°04' 14.13" N y 75° 41' 07.15" O y una altitud de 1033 m, en zona de vida Bosque Húmedo Premontano (Bh-PM), según la clasificación de Holdrige.

Se colectaron muestras de suelo de 0-0,2 m de profundidad, en lotes de tres edades de cacao, 2 años, 4 años y 8 años, con tres repeticiones por edad. Se extrajeron raíces finas y suelo rizosférico de cada uno de los árboles, las muestras se conservaron a 5°C hasta su procesamiento.

Se realizó análisis químico de las muestras de suelo obtenidas. La extracción de los microorganismos se realizó por siembra directa y mediante agitación. En la siembra directa se cortaron fragmentos de raíces de 15 mm de longitud y fueron colocados sobre la superficie de los medios de cultivo. La extracción por agitación se realizó en 90 ml de una solución de agua peptonada 0.1 p/v. con 10 gramos de raíces finas y de suelo rizosférico que se agitaron durante 24 horas a 120 rpm. Los microorganismos fueron aislados por el método de siembra por

agotamiento. El aislamiento se realizó con dilución de la solución extractora depositada en las cajas de Petri con los medios de cultivo, en cámara de flujo laminar. Las diluciones utilizadas fueron  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-7}$ .

Los medios para aislamiento fueron Agar Nutritivo para Bacterias (20 g/l de Agar nutritivo) y PDA para Hongos (para 1L: 400 g de extracto de papa, 20 g de glucosa, 15 g de Agar, 3 g de sulfato de amonio, ácido láctico al 25%, relación 1-100 v/v), se esterilizaron en autoclave por 20 minutos a 120°C y 1.5 psi y se repartieron asépticamente en cajas Petri.

Luego de la siembra de los microorganismos las cajas fueron selladas con película de vinilo y marcadas. Se incubaron por 48 horas a temperatura ambiente (25° C) y luego se procedió a reaislar hasta obtener colonias puras. Se realizó descripción macroscópica y microscópica y Tinción de Gram. Después se sembraron en medios de cultivo específicos (tabla 1) para determinar grupos funcionales celulolíticos en Agar-CMC, amilolíticos en Agar-almidón, proteolíticos, solubilizadores de fosfato y fijadores de nitrógeno (Wood, 1980; Wood, 1980; Döbereiner y Day, 1976; Sundara Rao y Sinha, 1963).

Se observaron los resultados de la reacción bioquímica después de 48 horas de incubación, con las tinciones indicadoras, para los celulolíticos con rojo congo; para los amilolíticos con Lugol; para los proteolíticos con HCl 0.1 Normal. Para los solubilizadores de fosfato se evaluó el cambio de color del medio y para fijadores de nitrógeno, se tomó en cuenta el crecimiento en el medio.

**Tabla 1.** Composición de los medios específicos para aislar microorganismos de los cinco grupos funcionales

Amilolíticos <sup>1</sup>	g L <sup>-1</sup>	Celulolítico <sup>2</sup>	g L <sup>-1</sup>	Proteolíticos <sup>3</sup>	g L <sup>-1</sup>	Bacterias Fijadoras de Nitrógeno <sup>4</sup>	g L <sup>-1</sup>	PSM Solubilizadores de Fosfatos <sup>5</sup>	g L <sup>-1</sup>
Peptona	10	Carboximetil celulosa	5	Caseína	10	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5
NaCl	5			Extracto de levadura	0.1	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1	KCl	0.2
Extracto de Carne	5	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.3
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2			NaCl	0.1	MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0.004
Almidón soluble	2	Solución salina 0.85%	50 ml	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.5	CaCl <sub>2</sub>	0.02	FeSO <sub>4</sub>	0.002
				Solución salina 0.85%	50 ml	FeCl <sub>3</sub>	0.01	NaCl	0.2
Agar-Agar	20	Agar-Agar	15			MoO <sub>4</sub> Na 2H <sub>2</sub> O	0.002	Glucosa	10
				Agar-Agar	15	Ácido málico	5	Extracto de levadura	0.5
<sup>1</sup> Wood (1980), <sup>2</sup> Wood (1980), <sup>3</sup> Döbereiner y Day (1976), <sup>4</sup> Sundara Rao y Sinha (1963) Se seleccionaron algunas cepas y se realizó identificación bioquímica por el sistema de identificación BBL Crystal.						Azul de Bromotímol (0.5%)	5 ml	Púrpura de bromocresol	0.1
						Agar-Agar	15	Fosfato de calcio tribásico	5
								Agar-Agar	15

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Suelos

Los suelos del cacaotal estudiado provienen de cenizas volcánicas y se caracterizan por tener un pH ácido y una alta capacidad de retención de humedad. El pH medido osciló entre 5 y 6 interpretado como ligeramente ácido, en suelos con pH de 5.6 la mayoría

de los microorganismos beneficiosos para los cultivos existen, y sus enzimas son activas (Calvo, *et al.*, 2008). El contenido de materia orgánica en el suelo fluctuó entre 5-10% calificado entre bajo y medio (Tabla 2), dichas características, favorecen el desarrollo de algunos microorganismos, que podrían contrarrestar la retención de fosfatos por la presencia de alofan, constituyente principal de la fracción arcilla en estos suelos (Quintero, 1990).

**Tabla 2.** Características químicas del suelo rizosférico del cacao de la Granja Luker

Muestra	Textura				pH	M.O. %	Al	Ca	Mg	K	P	S	Fe	Mn	Cu	Zn	B
	A%	L%	Ar%	Clase													
AL 35	62	28	10	FA	5.7	10.4	-	6.0	3.6	0.58	34	10	88	5	13	6	0.42
AL 21	56	20	24	FArA	5.2	2.9	1	6.1	2.5	0.42	32	9	103	12	11	1	0.25
AL 22	42	28	30	FAr	4.7	2.9	4.2	3.2	1.7	0.37	58	6	300	11	15	3	0.15
AL 23	40	28	32	FAr	5.5	5.2	-	10.6	5.1	0.80	30	9	145	9	11	5	0.44
AL 24	40	24	36	FAr	5.3	3.1	0.7	5.5	3.0	0.29	10	7	186	7	13	3	0.12
AL 25	42	28	30	FAr	5.7	4.1	-	7.4	3.4	0.10	8	9	156	7	10	4	0.13
AL 26	34	30	36	FAr	5.6	4.9	-	10.7	4.8	0.21	7	8	122	6	12	3	0.10
AL 27	60	28	12	FA	5.5	5.8	-	3.0	1.1	0.34	24	5	59	1	8	5	0.20
AL 28	56	34	10	FA	5.8	6.9	-	3.3	1.3	0.55	36	6	60	3	11	5	0.17
AL 29	56	34	10	FA	5.6	6	-	2.9	0.9	0.40	26	7	74	3	11	3	0.49
AL 30	60	30	10	FA	5.8	7.1	-	4.3	1.7	0.27	15	4	65	2	16	5	0.10
AL 31	60	30	10	FA	5.6	6.6	-	2.7	1.4	0.23	15	7	105	3	9	8	0.17
AL 32	60	32	8	FA	6.0	10.2	-	7.5	3.7	0.29	36	7	43	5	6	15	0.27
AL 33	58	32	10	FA	5.0	8.4	1.7	1.6	0.6	0.15	46	6	142	1	22	2	0.29
AL 34	58	32	10	FA	5.5	9.9	-	33.5	1.6	0.20	36	10	89	4	16	4	0.25

Metodologías de caracterización (Textura: Bouyoucos, pH solución 1:1 suelo agua, Al, Ca, Mg extracción con acetato de amonio 0,1N, P Bray II, S: Fosfato monocalcico 0.008M; Fe, Mn, Cu, Zn EDTA, B en agua caliente)

### Microorganismos

En un primer paso se aislaron 39 morfotipos, de los cuales se seleccionaron 26 por su mayor frecuencia en las muestras de rizosfera de cacao y presencia en las de raíces, estos morfotipos de bacterias (Tabla 3), caracterizados microscópicamente correspondieron a cocos y bacilos en colonias, en su mayoría Gram positivas. Macroscópicamente, las colonias generalmente fueron irregulares con superficie lisa o rugosa, el color que predominó fue el blanco, sin embargo, se evidenció un morfotipo color rojo, B37

(226) y B38 (226A), que sobresale por presentar actividad en la mayoría de las funcionalidades químicas estudiadas.

Se aislaron 12 morfotipos de hongos (Tabla 4), en su mayoría colonias blancas con crecimiento algodonoso, presencia de algunas rosadas y otras verdes, siendo una de las verdes la de mejor comportamiento en cuanto a actividad funcional en los medios específicos H39 (300) (Tabla 5).

**Tabla 3.** Caracterización macro y microscópica de las bacterias provenientes de rizosfera y raíces de cacao

Código	Tinción Gram	Forma	Color	Forma	Superficie
B16 (200)	+	Cocos	Blanco	Irregular	Lisa
B17 (201 a)	+	Bacilos	Blanco	Irregular	Lisa
B20 (203a)	+	Cocos	Crema	Ovalado	Lisa
B21 (203b)	+	Cocos	Crema	Ovalado	Lisa
B23 (207)	+	Bacilos	Blanco	Irregular	Rugosa
B24 (208)	+	Cocos	Blanco	Circular	Rugosa
B27 (212)	+	Bacilos	Crema	Irregular	Lisa
B28 (213)	+	Cocos	Blanco	Irregular	Rugosa
B29 (216)	+	Bacilos	Blanco	Circular	Rugosa
216b	+	Bacilos	Blanco	Circular	Rugosa
B30 (219)	+	cocos en racimos	Blanco	Circular	Rugosa
219A	+	cocos en racimos	Blanco	Circular	Rugosa
219B	+	cocos en racimos	Blanco	Circular	Rugosa
B31 (220)	+	Bacilos	Blanco	Circular	Lisa
B32 (221a)	-	Bacilos	Blanco	Irregular	Rugosa
B33 (221b)	+	Cocos	Blanco	Irregular	Lisa
B34 (222)	-	bacilos en cadena	Blanco	Irregular	Rugosa
B35 (223)	+	Cocos	Blanco	Irregular	Lisa
B36 (224)	+	Bacilos	Blanco	Irregular	Rugosa
B37 (226)	+	cocos pequeños	Rojo	Circular	Lisa
B38 (226A)	+	cocos pequeños	Rojo	Circular	Lisa
B39 (229)	-	Bacilos	Blanco	Circular	Rugosa
B41 (232)	+	bacilos en cadena	Blanco	Irregular	Rugosa
B42 (233)	+	Cocos	Blanco	Irregular	Lisa
B44 (235)	+	Cocos	Crema	Irregular	Lisa
B45 (236)	+	Cocos en cadena	Blanco	Circular	Rugosa

La población de bacterias aisladas de la rizosfera del cacao fue mayor en diversidad y número que la de los hongos, similar a lo reportado por Calvo y colaboradores (2008) para cultivos de papa. En el mismo sentido Silva-Dantas y colaboradores (2009) aseguran que la actividad rizósferica genera un hábitat favorable tanto para hongos como bacterias, pero el crecimiento de estas últimas es mayor; en general en el suelo se observa que el comportamiento de las poblaciones microbianas es el mismo, con mayor densidad y diversidad de bacterias Alexander (1994).

En el suelo más cercano a la raíz de cacao, Mora (2007) corroboró la mayor actividad microbiana y expresa que sucede por la presencia de mayor cantidad de exudados, escamaciones, mucilagos y gomas fácilmente metabolizables por los microorganismos, de donde obtienen su energía. Entre los exudados de la rizosfera se han encontrado mucilagos y compuestos de bajo peso molecular, aminoácidos, proteínas y enzimas, azúcares, ácidos orgánicos y vitaminas, entre otros, que son fuente energética y nutricional para las bacterias (Holguin, 2008).

**Tabla 4.** Caracterización macroscópica de los hongos provenientes de rizosfera y raíces de cacao

Código	Color Centro	Color Borde	Crecimiento
H 39 (300)	Verde	Blanco	Polvoso
H 40 (301)	Blanco	Blanco	Lanilla
H 41 (303)	Blanco	Blanco	Algodonoso
H 42 (304)	Rosado	Blanco	Algodonoso
H 43 (305)	Blanco	Blanco	Algodonoso
H 44 (306)	Blanco	Blanco	Lanilla
H 45 (307)	Rosado	Blanco	Algodonoso
H 46 (308)	Verde	Blanco	Algodonoso
H 47 (311)	Blanco	Amarillo	Algodonoso
H 48 (312)	Blanco	Blanco	Lanilla
H 49 (313)	Blanco	Blanco	Lanilla
H 50 (314)	Rosado	Blanco	Lanilla

De las bacterias 14 cepas presentaron función amilolítica, 17 proteolítica, 18 fijadoras de nitrógeno y 16 con más del 50% de actividad solubilizadora de fosfato (Tabla 5). De los hongos aislados, dos cepas tienen funcionalidad amilolítica (H39 y H50), cuatro proteolítica (H39, H42, H43 y H49) y solo uno presentó actividad solubilizadora de fosfatos (H39).

**Tabla 5.** Actividad de las bacterias por grupos funcionales

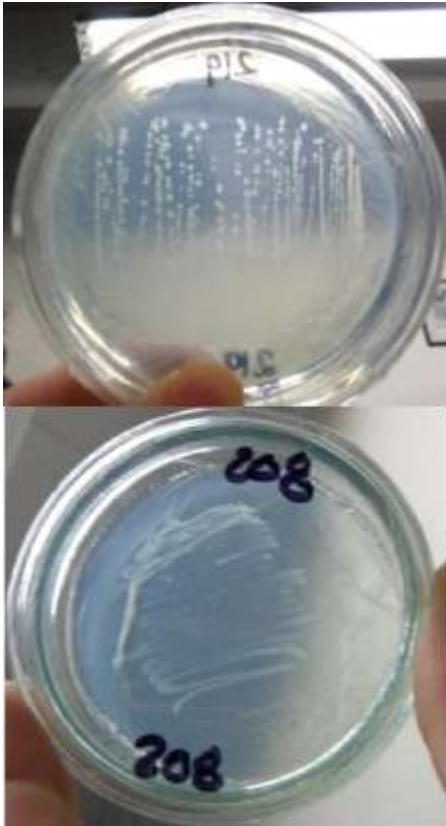
Código	Amilo lítico	Proteo lítico	Bacterias Fijadoras de Nitrógeno	Solubilizadoras de fosfatos
B16 (200)		x		
B17 (201 a)				x
B20 (203a)				x
B21 (203b)			x	x
B23 (207)		x	x	x
B24 (208)	x	x	x	x
B27 (212)		x	x	x
B28 (213)			x	
B29 (216)	x		x	
216b	x		x	
B30 (219)	x	x	x	
219A	x	x	x	x
219B	x	x	x	x
B31 (220)		x		x
B32 (221a)	x	x	x	x
B33 (221b)		x		x
B34 (222)			x	
B35 (223)		x	x	x
B36 (224)	x	x	x	
B37 (226)	x	x		x
B38 (226A)	x	x		x
B39 (229)	x	x	x	
B41 (232)	x	x	x	
B42 (233)				x
B44 (235)	x	x		x
B45 (236)	x	x	x	

El régimen de humedad de la zona de vida Bh - PM favorece la cantidad y diversidad de microorganismos encontrados en la rizosfera (Vera *et al.*, 2002), además las secreciones radicales de alta diversidad de sustancias y compuestos pueden llegar a producir incluso cambios de pH, disponibilidad de sustratos, nutrientes y factores de crecimiento microbiano, modificando así su dinámica poblacional (Araújo *et al.*, 2006; Reyes & Valery, 2007), igualmente estas secreciones, benefician las bacterias y aumentan su habilidad para adherirse a la superficie de la raíz (rizoplano) (Saharan y Nehra, 2011, Holguin, 2008).

En cacao la acumulación de hojarasca es creciente con la edad del cultivo, en Camerún se cuantificó 7.2 Mg ha<sup>-1</sup>, en plantaciones de 35 años (Norgrove y Hauser, 2013), en Colombia oscila entre 400 y 2000 kg en plantaciones entre 10 y 15 años (Leiva *et al.*, 2012), con estos volúmenes de hojarasca en el cultivo la descomposición celulolítica reviste importancia, además porque la materia orgánica al ser oxidada por los microorganismos libera nitrógeno, de tal manera que ésta constituye la principal fuente de nitrógeno para las plantas (Mantilla *et al.*, 2009).

La ausencia de microorganismos celulolíticos en las muestras procesadas, concuerdan con lo reportado por Osorio (2012) para cultivos de vainilla, quien reporta menor presencia de este tipo de microorganismos en la rizosfera de las plantas, posiblemente porque este grupo de microorganismos se encuentran asociados con mayor frecuencia a la hojarasca, que transformada es la fracción celulósica del suelo.

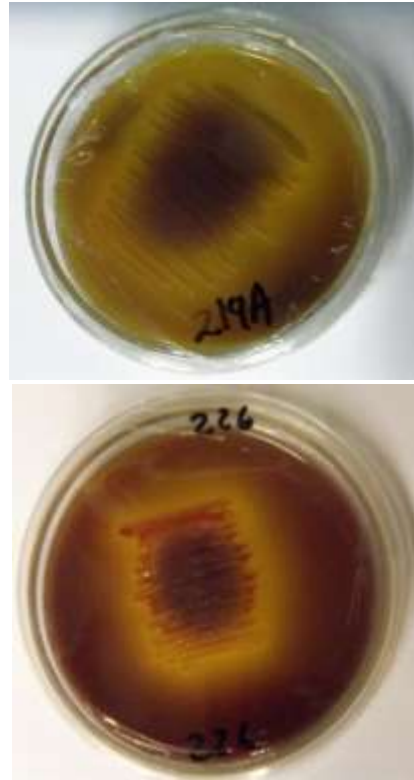
El 45% de los morfotipos de bacterias aislados presentaron actividad fijadora de nitrógeno (Figura 1) o solubilizadora de fosfato (Figura 2), característica que puede favorecer la nutrición para el cultivo (Saharan y Nehra, 2011) ya que se reporta que casi todos los suelos donde se cultiva cacao tienen como nutriente limitante el fósforo (Ahenkorah, 1981; Snoeck, 2006). El empleo de bacterias fijadoras de nitrógeno en los cultivos optimiza la disponibilidad del nutriente en la rizosfera y podría disminuir la adición de fertilizantes (Wedhastri *et al.*, 2012) práctica que conduce a la sostenibilidad del sistema.



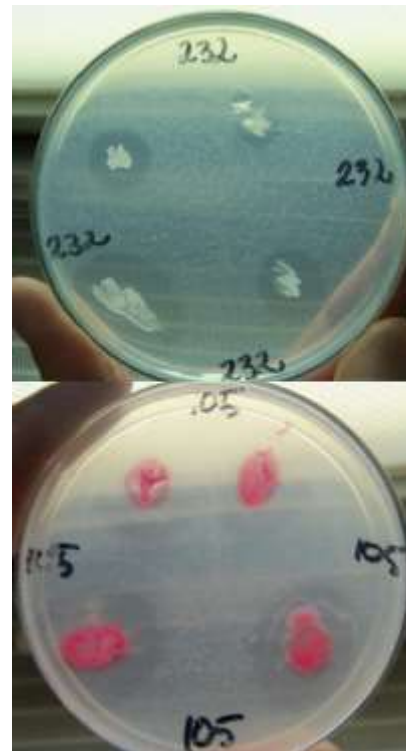
**Figura 1.** Bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de rizosfera y raíces de cacao, en el medio selectivo FBN (Döbereiner y Day, 1976).

El interés en utilizar microorganismos que puedan solubilizar fosfatos minerales y orgánicos, por medio de procesos que incluyen la acidificación, quelación y reacciones de óxido reducción, ha venido en aumento (Harris *et al.*, 2005), de tal manera que para el cultivo de cacao que crece en suelos con bajo pH la presencia de estas bacterias contribuye a la nutrición. Actualmente, se considera la solubilización de fosfatos como una característica clave de los microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPR) (Patiño-Torres y Sánchez de Prager, 2012).

El 70% de los morfotipos de bacterias presentó actividad proteolítica (Figura 3). En el proceso de proteólisis resultan moléculas nitrogenadas de menor peso, que permean la membrana y pueden ser asimilados y metabolizados por otros organismos (Mrkonjic Fuka *et al.*, 2007; Mrkonjic Fuka *et al.*, 2008), este mecanismo contribuye en el ciclo y aporte de nitrógeno a los cultivos (Torres y Lizarazo, 2006), en cacao la raíces superficiales en ocasiones se fijan a la hojarasca así que la presencia de estos microorganismos potencializa la toma de nutrientes.

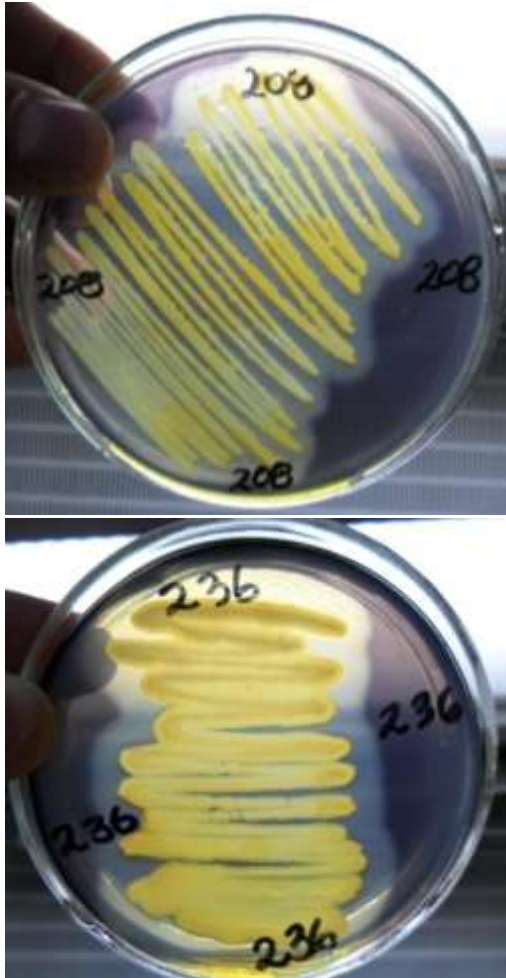


**Figura 2.** Actividad solubilizadora de fosfato en medio SRS aisladas de rizosfera y raíces de cacao

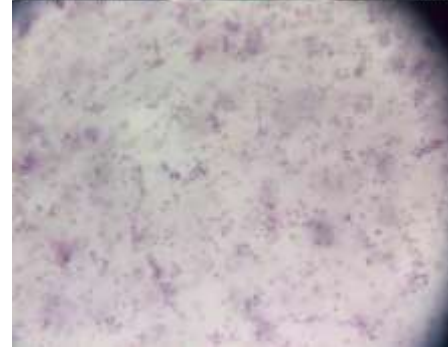
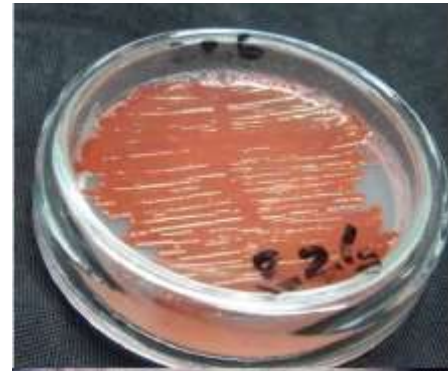


**Figura 3.** Microorganismos con funcionalidad proteolítica en medio de Wood (1980) aisladas de rizosfera y raíces de cacao.

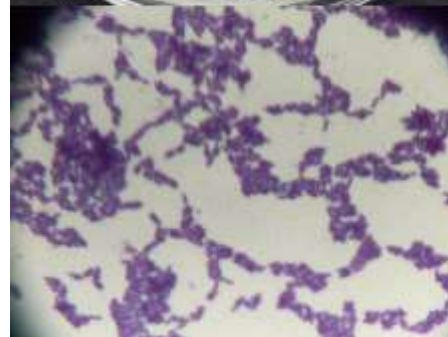
El 50% de las bacterias presentaron actividad amilolítica (Figura 4). La recuperación de estas colonias en los cultivos aporta en el ciclo del carbono (Pozuelo-Gonzalez *et al.* 1992; Matsumoto, *et al.* 2004) provee sustancias que favorecen el metabolismo y la acción de otros grupos de importancia en el aporte de nutrientes para las plantas (Torres y Lizarazo, 2006).



**Figura 4.** Microorganismos con funcionalidad amilolítica en medio de Wood (1980), aislados de rizosfera y raíces de cacao.



(A)



(B)

**Figura 5.** Bacterias con diversa funcionalidad: amilolítica, proteolítica, solubilizadora de fosfatos (226 y 219B) y fijadora de nitrógeno (219B). A. cocos , 40x B. Cocos en racimos 40 x.

Se realizó la identificación de algunas de las cepas bacterianas aisladas durante el trabajo, se escogieron aquellas que presentaron actividad en el mayor número de medios específicos (Tabla 7).



**Tabla 7.** Identificación bioquímica por BBL Crystal

Código	Tinción Gram	Identificación
208	+	<i>Lactococcus lactis</i>
219	+	<i>Leuconostoc citreum</i>
224	+	<i>Corynebacterium renale</i>
226	+	<i>Staphylococcus vitulinus</i>
229	-	<i>Serratia marcescens</i>
232	+	<i>Corynebacterium renale</i>
236	+	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>

Las bacterias identificadas, son utilizadas ampliamente en la industria, especialmente en la fermentación de alimentos (Lee y Moon, 2003; Hemme y Foucaud-Scheunemann, 2004; Srivastava *et al.*, 2006). *Lactococcus lactis* tiene un especial interés debido a su doble potencial para la producción de ácido láctico y componentes de aroma (Boutibonnes *et al.*, 1995).

Desde el punto de vista industrial, las corinebacterias del suelo se utilizan ampliamente en la producción de aminoácidos, detergentes, degradación de parafinas, por tanto se han aplicado técnicas de ingeniería genética que han conllevado a descubrir un gran número de plásmidos de corinebacterias (Srivastava *et al.*, 2006).

Mazzafera y colaboradores (1996), reportan estudios en los que se ha evaluado la habilidad de *Serratia marcescens* para degradar cafeína como la única fuente de nitrógeno y carbono. Esta cepa ha sido aislada de suelos en los cuales se ha cultivado café durante aproximadamente 40 años. *Staphylococcus sp.* ha sido aislado de diferentes fuentes ambientales como tierra, arena, agua y aire, aunque también pueden encontrarse en las mucosas de los animales de sangre caliente (Kloos and Schleifer, 1986).

Con estos resultados, la diversidad y el número de cepas, se evidencia el alto potencial que tiene la rizosfera de cacao para la extracción de microorganismos promisorios para posteriores pruebas y selección como insumo para biofertilizantes.

## CONCLUSIONES

Los microorganismos aislados a partir de la rizosfera y las raíces del cacao en distintas edades, presentaron diversa funcionalidad, estos organismos participan con distintos mecanismos en la toma de nutrientes del cultivo.

La población de bacterias aisladas de la rizosfera del cacao fue mayor en diversidad y número que la de los hongos.

Las bacterias 226 y 219 presentaron actividad en el mayor número de medios específicos para grupos funcionales, por ello se perfilan como promisorias.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALEXANDER, M. (1994). Introducción a la Microbiología de Suelos. Editor S. A. México.
- ACUÑA, O., PEÑA, W., SERRANO, E., POCASANGRE, L., ROSALES, F., DELGADO, E., TREJOS, J., SEGURA, A. (2006). La importancia de los microorganismos en la calidad y salud de suelos. XVII Reunión Internacional de la Asociación para la cooperación en Investigaciones de banano en el Caribe y en América Tropical. Joinville-Santa Catarina-Brasil.
- AHENKORAH, Y. (1981). The influence of environment on growth and production of the cacao tree: Soils and nutrition. Proceeding 7th International Cocoa Research Conference. Douala, Cameroun, p 167-176.
- ARAÚJO, Q., A. SOBRAL, M., FARIAS, T., COSTA NETO, I., CAZORLA, R., CHEPOTE, R., ARGOLLO. (2006). Atividade microbiana em solo cultivado com clones de cacau em diferentes tamanhos de covas. *Agrotropica* 18: 39-44.
- ARNOLD, A., HERRE, E. (2003). Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia* 95: 388-398.
- BACA, B., SOTO, L., PARDO, M. (2000). Fijación Biológica del Nitrógeno. Elementos: Ciencia y cultura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla 7 (038): 43-49.
- BLAIR, G.J., R. D. B. LEFROY Y L. LISLE. 1995. Soil carbon fractions based on their degree of oxidation, and the development of a carbon management index for agricultural systems. *Australian Journal of Agricultural Research* 46: 1459-1466.
- BOUTIBONNES, P., BISSON, V., THAMMAVONGS, B., HARTKE, A., PANOFF, J., BENACHOUR, A., AUFRAY, Y. (1995). Induction of thermotolerance by chemical agents in *Lactococcus lactis* subsp.

- lactis* IL1403. International Journal of Food Microbiology 25: 83-94.
- CALVO, P., MENESES, L., ZÚÑIGA, D. (2008). Estudio de las poblaciones microbianas de la rizosfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. Ecología Aplicada 7 (1,2): 141-148.
- DÖBEREINER, J., DAY, J. (1976). Associative symbioses in tropical grasses: characterization of micro-organisms and dinitrogen fixing sites, pp. 518-538, *En*: W. E. Newton y C. J. Nyman, (eds.) Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation. Washington State University Press, Pullman, Washington, U.S.A.
- HARRIS, J., NEW, P., MARTIN, P. (2005). Laboratory tests can predict beneficial effects of phosphate-solubilising bacteria on plants. Soil Biol. Biochem. 38, 1521-1526.
- HEMME, D., FOUCAUD-SCHEUNEMANN, C. (2004). Leuconostoc, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. International Dairy Journal 14: 467-494.
- HOFMOCKEL, K., FIERER, N., COLMAN, B., JACKSON, R. (2010). Amino acid abundance and proteolytic potential in North American soils. Oecologia 163: 1069-1078.
- HOLGUIN Z., G. (2008). La comunicación entre bacterias y plantas. Ciencia. abril-junio: 72-78.
- HU, C., QI, Y (2013). Long-term effective microorganisms application promote growth and increase yields and nutrition of wheat in China. European Journal of Agronomy 46:63-67.
- KARAGÖZ, K., ATEŞ, F., KARAGÖZ, H., KOTAN R., ÇAKMAKÇ, R. (2012). Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from the rhizosphere of grapevine grown in alkaline and acidic soils. European Journal of Soil Biology 50: 144-150.
- KLOOS, W.E., SCHLEIFER, K.H., (1986). Genus IV. Staphylococcus. *En*: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1013-1035.
- LARA, C., VILLALBA, M., OVIEDO L. (2007). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. Revista Colombiana de Biotecnología 9 (2): 6-14.
- LACHENAUD, P., PAULIN, D., DUCAMP, M., THEVENIN, J. (2007). Twenty years of agronomic evaluation of wild cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) from French Guiana. Scientia Horticulturae. 113(4): 313-321.
- LEAUNGVUTIVIROJ, C., PIRIYAPRIN, S., LIMTONG, P., SASAKI, K. (2010). Relationships between soil microorganisms and nutrient contents of *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash and *Vetiveria nemoralis* (A.) Camus in some problem soils from Thailand. Applied Soil Ecology 46: 95-102.
- LEE, K., MOON, S-H. (2003). Growth Kinetics of *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis* Harboring Different Plasmid Content. Current Microbiology 47: 17-21.
- LEIVA, E., DUQUE, L., RAMÍREZ, R. (2012). Captura de Carbono en el agroecosistema de Cacao. *En* XIX Congreso Latinoamericano de La Ciencia Del Suelo. Mar del Plata, Argentina.
- LÓPEZ, M., LÓPEZ DE ROJAS, I., ESPAÑA, M., IZQUIERDO, A., HERRERA, L. (2007). Efecto de la fertilización inorgánica sobre la disponibilidad de nutrimentos en el suelo, nivel nutricional de la planta y hongos micorrízicos arbusculares en plantaciones de *Theobroma cacao*. Agronomía Tropical 57(1): 31-43.
- MANTILLA-PAREDES, A., G. I. CARDONA, C. P. PEÑA-VELEGAS, U. MURCIA, M. RODRÍGUEZ Y M. ZAMBRANO. 2009. Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana. Revista de Biología Tropical 57 (4): 915-927.
- MARTÍNEZ-VIVEROS, O., M.A. JORQUERA, D.E. CROWLEY, G. GAJARDO, M.L. MORA. (2010) Mechanisms and practical considerations Involved in plant growth promotion by Rhizobacteria. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 10 (3): 293-319.
- MATSUMOTO, L., MARTINES, A., AVANZI, M., ALBINO, U., BRASIL, C., SARIDAKIS, D., RAMPAZO, L., ZANGARO, W., ANDRADE. G. (2004). Interactions among functional groups in the cycles of carbon, nitrogen and phosphorus in the rhizosphere of three successional species of tropical woody trees. J. Appl. Soil Ecol. 10 (1016):1-9.
- MAZZAFERA, P., OLSSON O., SANDBERG, G. (1996). Degradation of Caffeine and Related Methylxanthines by *Serratia marcescens* Isolated from Soil Under Coffee Cultivation. Microbial Ecology 31:199-207.
- MORA, J. (2007) La actividad microbiana: un indicador integral de la calidad del suelo. Revistas Científicas Universidad de Caldas. Disponible: [http://lunazul.ucaldas.edu.co/index.php?option=com\\_content&task=view&id=223&Itemid=223](http://lunazul.ucaldas.edu.co/index.php?option=com_content&task=view&id=223&Itemid=223)
- MRKONJIC, M., ENGEL, M., MUNCH, J., SCHLOTTER, M. (2007). Characterization of

- Proteolytic Microbes and Their Activities in Soils. Biology of the Nitrogen Cycle. Edited by H. Bothe, S.J. Ferguson and W.E. Newton. Chapter 19: 303-309.
- MRKONJIC, M., ENGEL, M., GATTINGER, A., BAUSENWEIN, U., SOMMER, M., MUNCH, J., SCHLOTTER, M. (2008). Factors influencing variability of proteolytic genes and activities in arable soils. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 1646-1653.
- NORGROVE, HAUSER, (2013). Carbon stocks in shaded *Theobroma cacao* farms and adjacent secondary forests of similar age in Cameroon. *Tropical Ecology* 54 (1): 15-22.
- OSORIO, A. (2012). Efecto de materiales orgánicos, fertilizantes e inóculos microbiales sobre el crecimiento y nutrición de plántulas de Vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks). Trabajo presentando como requisito parcial para la obtención del título de Mágister en Bosques y Conservación Ambiental. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias.
- PATIÑO, C., SÁNCHEZ, M. (2012). Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos, habitantes de la rizosfera de chontaduro (*b. Gassipaes kunth*). *Biocología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 10 (2): 177 – 187.
- POZUELO, J., GUTIÉRREZ, F., LUNARES, F., BERMÚDEZ, F. (1992). Densidad y actividad de microorganismos del ciclo del carbono bajo el dosel de *Myrica gale* L. *Microbiología SEM (Sociedad española de microbiología)* 8 (1): 32-39
- POZUELO, J. (1991). Estudio de grupos funcionales de microorganismos edáficos en la rizosfera de *Alnus glutinosa* (L.) GAERTN. Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Complutense Madrid. Memoria para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas.
- QUINTERO, J. (1990). Comportamiento del fósforo en suelos derivados de cenizas volcánicas. *Revista Académica Colombiana de Ciencias* 17(66):467-476.
- REYES I., VALERY, A. (2007). Efecto de la fertilidad del suelo sobre la microbiota y la promoción del crecimiento (*Zea mays* L.) con *Azotobacter* spp. *Bioagro*. 19: 117-126.
- SAHARAN, B., NEHRA, V. (2011). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research* 2011: LSMR-21:1-30.
- SILVA, J., PEREIRA, A., FURTADO, M., BEZERRA, V. (2009). Interações entre grupos de microorganismos com a rizosfera. *Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia* 2 (2): 213-218.
- SNOECK, D. (2006). The soil diagnostic method for formulating fertilizer requirements on cocoa in Ghana. 15th International Cocoa Research Conference. 387-394
- SRIVASTAVA, P., NIHARIKA, N., DEB, J. (2006). Characterization of broad host range cryptic plasmid pCRI from *Corynebacterium renale*. *Plasmid* 56: 24-34.
- SUNDARA, W., SINHA, M. (1963). Phosphate dissolving microorganisms in the soil and the rhizosphere. *Indian Journal of Agricultural Science* 33:272–278.
- TORRES, M., LIZARAZO, L. (2006). Evaluación de grupos funcionales (ciclo del C, N, P) y actividad de la fosfatasa ácida en dos suelos agrícolas del departamento de Boyacá (Colombia). *Agronomía Colombiana* 24(2): 317-325.
- VERA, D., PÉREZ, H., VALENCIA, H. (2002). Distribución de hongos solubilizadores de fosfatos en dos microhábitas de suelo de dos unidades fisiográficas de Guaviare, Colombia. *Acta Biológica Colombiana* 7(1): 23.
- WEDHASTRI, S., YUDIANTI, N., WIDADA, J., BAON, J. (2012). Ability of Non Symbiotic Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Coffee Plant Rhizosphere and Their Effects on Robusta Coffee Seedlings. *Journal of Agricultural Science and Technology A* 2: 660-666.
- WOOD, P. (1980). Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides. *Carbohydrate Research* 85:271-287.
- YAZDANI, M., BAHMANYAR, M., PIRDASHTI, H., ESMAILI, M. (2009). Effect of Phosphate Solubilization microorganisms (PSM) and Plant Growth promoting Rhizobacteria (PGPR) on yield and yield Components of Corn (*Zea mays* L.), *International Journal of Biological and Life Sciences* 5(2): 80- 83.