

## Aislamiento y selección de rizobacterias solubilizadoras de fósforo a partir de cultivos de *Theobroma cacao* L.

### Isolation and selection of phosphorus solubilizing rhizobacteria from *Theobroma cacao* L. crops

### Isolamento e seleção de rizobactérias solubilizantes de fósforo de culturas de *Theobroma cacao* L.

Alvarado Ibáñez Juan Carlos<sup>1</sup>, Gutiérrez Araujo Mayra Karina<sup>2</sup>

#### RESUMEN

La agricultura intensiva promueve el uso desmedido de fertilizantes químicos que ocasionan la inmovilización de nutrientes en el suelo, optando como alternativa de solución el empleo de fertilizantes a base de microorganismos. Este trabajo de investigación tuvo como objetivo aislar y seleccionar bacterias nativas con capacidad solubilizadora de fósforo a partir de muestras de suelo rizosférico de *Theobroma cacao* colectadas en las provincias de Bagua y Utcubamba de la región Amazonas. Las 23 muestras de suelo procesadas presentaron textura franco-limosa principalmente, y pH variable entre 6.24 y 7.75, de las cuales se aisló 42 cultivos de rizobacterias provenientes de los sectores Bagua, Vista Hermosa, Los Olivos, Santa Teresa, El Vivero, La Peca y Cajaruro de las provincias de Bagua y Utcubamba. Se realizó el aislamiento primario en medio de cultivo no selectivo y la selección secundaria en medio Pikovskaya, observándose halos de solubilización del fosfato tricálcico; al mismo tiempo se realizó la caracterización macro y microscópica de las colonias aisladas con capacidad solubilizadora. Se midieron los Índices de Solubilización (IS) en placa de cada cultivo puro aislado, seleccionándose dos cultivos super solubilizadores con  $IS > 3$ . Se concluye que a partir de la rizósfera de *Theobroma cacao* se logró aislar varios cultivos puros de bacterias solubilizadoras de fósforo, seleccionándose dos de ellas como super solubilizadoras, las cuales fueron conservadas en medio de cultivo adicionado con glicerol para su posterior identificación.

**Palabras clave:** Bacterias solubilizadoras de fósforo, *Theobroma cacao*, microorganismos promotores del crecimiento vegetal.

#### ABSTRACT

Intensive agriculture promotes the excessive use of chemical fertilizers that cause the immobilization of nutrients in the soil, opting as an alternative solution the use of fertilizers based on microorganisms. This research work aimed to isolate and select native bacteria with phosphorus solubilizing capacity from samples of *Theobroma cacao* rhizospheric soil collected in the provinces of Bagua and Utcubamba in the Amazon region. The 23 processed soil samples presented mainly silt-free texture, and a variable pH between 6.24 and 7.75, of which 42 rhizobacterial cultures from the Bagua, Vista Hermosa, Los Olivos, Santa Teresa, El Vivero, La Peca and Cajaruro sectors were isolated from the provinces of Bagua and Utcubamba. Primary isolation was performed in non-selective culture medium and secondary selection in Pikovskaya medium, with halos of solubilization of tricalcium phosphate; At the same time, macro and microscopic characterization of isolated colonies with solubilizing capacity was performed. Solubilization Indices (IS) were measured on plate of each isolated pure culture, selecting two super solubilizing cultures with  $IS > 3$ . It is concluded that from the rhizosphere of *Theobroma cacao* it was possible to isolate several pure cultures of phosphorus solubilizing bacteria, two of them being selected as super solubilizers, which were preserved in culture medium added with glycerol for later identification.

**Keywords:** Phosphorus solubilizing bacteria, *Theobroma cacao*, plant growth promoting microorganisms.

<sup>1</sup> Ms.Sc. En Microbiología, Universidad Nacional Intercultural Fabiola Salazar Leguía de Bagua; jalvarado@unibagua.edu.pe

<sup>2</sup> Ms.Sc. En Microbiología, Universidad Nacional de Trujillo

## RESUMO

A agricultura intensiva promove o uso excessivo de fertilizantes químicos que causam a imobilização de nutrientes no solo, optando como solução alternativa o uso de fertilizantes à base de microorganismos. Este trabalho de pesquisa teve como objetivo isolar e selecionar bactérias nativas com capacidade de solubilização de fósforo em amostras de solo rizosférico de *Theobroma cacao* coletadas nas províncias de Bagua e Utcubamba, na região amazônica. As 23 amostras de solo processadas apresentaram principalmente textura livre de lodo e pH variável entre 6,24 e 7,75, das quais 42 culturas de rizobactérias dos setores Bagua, Vista Hermosa, Los Olivos, Santa Teresa, El Vivero, La Peca e Cajaruro foram isoladas. as províncias de Bagua e Utcubamba. O isolamento primário foi realizado em meio de cultura não seletivo e a seleção secundária em meio Pikovskaya, com halos de solubilização do fosfato tricálcico; Ao mesmo tempo, foi realizada a caracterização macro e microscópica de colônias isoladas com capacidade de solubilização. Os índices de solubilização (IS) foram medidos em placa de cada cultura pura isolada, selecionando duas culturas super-solubilizantes com  $IS > 3$ . Concluiu-se que a partir da rizosfera de *Theobroma cacao* foi possível isolar várias culturas puras de bactérias solubilizantes de fósforo, duas das quais sendo selecionados como super-solubilizadores, que foram preservados em meio de cultura adicionado com glicerol para identificação posterior.

**Palavras-chave:** Bactérias solubilizadoras de fósforo, *Theobroma cacao*, microorganismos promotores de crescimento de plantas.

## INTRODUCCIÓN

La aplicación desmedida de fertilizantes químicos usados en la agricultura intensiva conlleva problemas de contaminación de suelo y agua que en definitiva, son capaces de alterar el normal funcionamiento de los ecosistemas naturales y de los agroecosistemas. Dentro de estos fertilizantes, destaca el fósforo cuya aplicación en forma de sales puede favorecer el enriquecimiento del elemento en aguas subterráneas, lagos y ríos y su consecuente eutrofización. Este proceso se ve incrementado cuando la cantidad aplicada como fertilizante supera a la utilizada por los cultivos, lo que produce desbalances nutricionales en las plantas, cambios en la composición de la microbiota del suelo y un consecuente incremento en los costos de producción (Moreno *et al.*, 2010).

El fósforo es el macronutriente más importante para el crecimiento y desarrollo de la planta, después del nitrógeno, ya que éste interviene en la generación de energía, síntesis de ácidos nucleicos, fotosíntesis, glucólisis, respiración, síntesis y estabilidad de membrana, activación e inactivación enzimática, reacciones redox, metabolismo de carbohidratos y fijación de nitrógeno (Vance *et al.*, 2003). Se sabe que la mayoría de los suelos de importancia agronómica en el planeta son deficientes en P biodisponible, por lo que éste debe ingresarse al agroecosistema desde fuentes externas. Sin embargo, el P es un recurso finito, no renovable. Lo cual, junto al hecho que los precios de los fertilizantes fosfóricos se incrementan constantemente, hace que sea necesario el uso de estrategias más sostenibles de fertilización (Patiño, 2010).

El fósforo presente en los suelos varía de 500 a 2000 ppm., sin embargo, la biodisponibilidad es muy baja (1ppm), ya que este se encuentra mayormente en forma precipitada formando fosfatos de aluminio, hierro, calcio y manganeso; por otro lado, las plantas solo pueden asimilar el fósforo en forma de ortofosfatos ( $H_2PO_4^-$  en suelos ácidos, y  $HPO_4^{2-}$  en suelos alcalinos) (Vance *et al.*, 2003, Alori *et al.*, 2017 y Gouda *et al.*, 2018). El fósforo es el elemento limitante para el crecimiento de las plantas, aunque solo represente el 0.05-0.50 % del peso seco de la planta (Vance *et al.*, 2003).

Entre los géneros de bacterias solubilizadoras de fosfato más eficientes, se han reportado *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* y *Serratia* (Sashidhar y Podile, 2010). Las bacterias que solubilizan fosfatos lo hacen mediante la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular como el ácido malónico, ácido glicólico,

ácido málico, ácido glutámico, ácido glucónico, ácido láctico, ácido succínico, ácido isobutírico, ácido acético, ácido oxálico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido alfa cetobutírico, y ácido itacónico (Alori *et al.*, 2017). Por otro lado, se tiene que los ácidos orgánicos más producidos por diversas especies de *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. putida*, *P. poae*, *P. trivialis*, *Pseudomonas spp.*) es el ácido glucónico y el ácido 2-cetoglucónico lo que resulta de la oxidación directa de la glucosa (Vyas y Gulati, 2009).

Aumentar la cantidad de países productores de alimentos y la producción constituye un reto para la humanidad en diversos sentidos, una de las alternativas que se ha encontrado para incrementar la producción y a la vez proteger el medio ambiente, es el empleo de bacterias solubilizadoras de fosfatos en cultivos de interés económico. La aplicación de estos inoculantes puede potenciar la eficiencia del uso del fósforo natural o sintético y optimizar la aplicación de fertilizantes en diversos cultivos (Salimpour *et al.*, 2010). Aislamientos realizados a partir de la rizósfera de la caña de azúcar demuestran la presencia de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* capaces de promover el crecimiento de las plantas mediante la producción de ácido indol acético, solubilización de fosfatos y producción de sideróforos (Mehnaz *et al.*, 2010; Mehnaz *et al.*, 2009).

Las bacterias solubilizadoras de fósforo son microorganismos del suelo que tienen la capacidad de transformar el P insoluble en formas asimilables para las plantas, con lo que contribuye a su disponibilidad en el suelo. Estas bacterias constituyen una excelente alternativa para reducir la cantidad de fertilizantes aplicados a diferentes cultivos. Estas bacterias solubilizan tanto el  $P_o$ , como el  $P_i$  e incluyen una amplia cantidad y diversidad de géneros. Sin embargo, se requieren estudios que profundicen en los que tienen mayor potencial de empleo para realizar procesos de solubilización y en sus mecanismos de acción (Gouda *et al.*, 2018).

Para compensar la baja disponibilidad de fósforo se suelen emplear fertilizantes químicos. Se estima que para el año 2030 se empleará más de 20 Ton por año; sin embargo, esto representa un riesgo para el medio ambiente ya que aproximadamente el 80% de fósforo aplicado en los cultivos permanece en el suelo lo que conllevaría a la eutrofización de lagos y estuarios marinos. Por otro lado, el elevado costo para adquirir y transportar los fertilizantes hace de éste un inconveniente más. (Patiño, 2010).

Por ello la importancia de continuar con la búsqueda de microorganismos que faciliten la solubilización de fosfatos del suelo y puedan ser usados como inoculantes para reducir el uso de fertilizantes

químicos y así asegurar un desarrollo sostenible para la agricultura. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue aislar y seleccionar bacterias solubilizadoras de fósforo a partir de suelo rizosférico de cultivo de *Theobroma cacao* en las provincias de Bagua y Utcubamba.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material y localización del área de estudio

El material de estudio estuvo conformado por muestras de suelo de la rizósfera de cultivos de *Theobroma cacao* obtenidas de campos cultivados en los distritos de Bagua y Utcubamba del departamento de Amazonas. Se tomaron en cuenta las condiciones climatológicas de temperatura, humedad relativa, contenido de materia orgánica del suelo y el pH del mismo, como condiciones de referencia del micro ecosistema microbiano.

### Recolección y transporte de muestras de suelo

Para la recolección de las muestra de cada parcela seleccionada al azar cultivadas con cacao, se utilizó una palana recta, considerando descartar los primeros 5 cm superficiales hasta una profundidad máxima de 30 cm, se homogenizó y se tomó una muestra representativa (500 g) en una bolsa plástica de primer uso. Cada muestra se registró con datos necesarios para su identificación y se llevaron al laboratorio de Biología y Biotecnología de la UNIFSLB para su procesamiento inmediato dentro de un contenedor plástico a baja temperatura.

### Aislamiento primario de bacterias solubilizadoras de fosfato

Se tomó 10 g de muestra de suelo previamente homogenizado, y se adicionó 90 ml de solución salina fisiológica 0.85%, para posteriormente realizar diluciones seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ . A partir de las diluciones preparadas se realizó la siembra por superficie en Agar cuenta colonias (PCA). Las placas de Petri fueron incubadas a 35°C por 48 horas. Las colonias aisladas fueron resembradas por puntura en Agar Pikovskaya e incubadas por 48 horas a 30°C.

### Aislamiento secundario de bacterias solubilizadoras de fosfato

A partir de las colonias obtenidas en la selección primaria se realizó repiques en Agar Pikovskaya de aquellas que presentaron actividad solubilizadora llevando a incubación bajo las mismas condiciones del aislamiento primario.

### Evaluación cualitativa de la solubilización de fosfatos

La capacidad cualitativa de solubilización se determinó en medio Pikovskayas. Las placas de Petri inoculadas con cada una de los cultivos puros se incubaron a 28°C durante 7 días hasta la aparición de

halos claros. El tamaño de los halos se calculó según el Índice de solubilización:  $IS=A/B$  (A: diámetro de la colonia + diámetro del halo y B: diámetro de la colonia) y se seleccionaron los cultivos puros que mostraron índices de solubilización mayores a 3; las mediciones se realizaron a los 3 y 7 días respectivamente después de la inoculación, con el fin de evaluar el comportamiento de las cepas a través de los días. Todos los ensayos se realizaron por duplicado (Walpola y Yoon Min-Ho, 2012).

### Conservación de cultivos puros

Los cultivos seleccionados en las pruebas cualitativas se sometieron a tinción de Gram y una vez definidas sus características macro y microscópicas se procedió a obtener cultivos axénicos en Agar Pikovskaya, los cuales se conservaron a 4°C para su posterior identificación.

## RESULTADOS

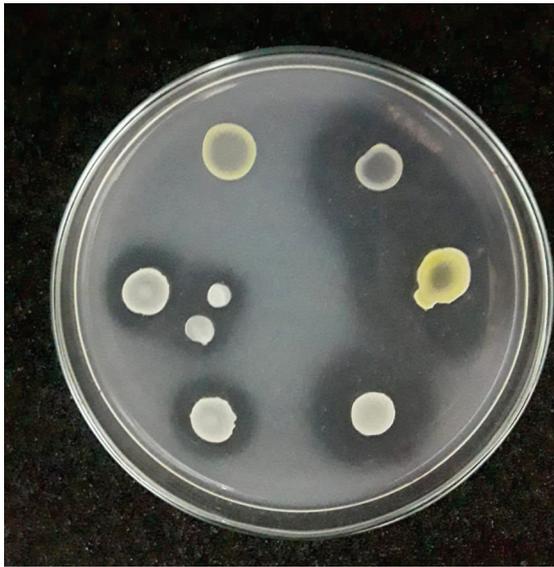
Los resultados del estudio de aislamiento y selección de bacterias solubilizadoras de fósforo a partir de la rizósfera de *Theobroma cacao*, mostraron la presencia de múltiples bacterias con variada capacidad de solubilizar el fósforo en seis de los siete sectores muestreados (Tabla 1). Las bacterias solubilizadoras de fósforo fueron aisladas a partir de suelo de textura franco-limosa principalmente, y pH variable entre 6.24 y 7.99 (Tabla 1), obteniendo la mayor cantidad de aislamientos a partir de las muestras del sector El Vivero (Tabla 1).

Sector muestreado	pH	Nº muestras	Nº cultivos aislados
Bagua	7.78	3	0
Vista Hermosa	7.75	3	6
Los Olivos	7.99	3	4
Santa Teresa	7.60	3	5
El Vivero	7.07	2	12
La Peca	6.24	3	10
Cajaruro	6.89	6	5
<b>Total</b>		<b>23</b>	<b>42</b>

**Tabla 1.** Sectores muestreados, pH, número de muestras y número de cultivos bacterianos aislados de muestras de suelo rizosférico de cultivo de *Theobroma cacao* de las provincias de Bagua y Utcubamba.

Sector muestreado	IS Mínimo	IS Máximo
Bagua	--	--
Vista Hermosa	2.4	4.3*
Los Olivos	0.9	1.2
Santa Teresa	1.5	3.0
El Vivero	0.6	2.8
La Peca	0.3	2.7
Cajaruro	0.7	1.4

\*Sector y cultivos bacterianos con mayor IS: CC01 y CC02



**Figura 1.** Halos de solubilización de fosfatos de diversas bacterias aisladas a partir de la rizósfera de cultivos de *Theobroma cacao* de las provincias de Bagua y Utcubamba.

## DISCUSIÓN

El pH de los suelos muestreados fue variado desde ligeramente ácidos con valores de 6.24 en el sector La Peca, hasta suelos alcalinos con pH de 7.99 en el sector de Vista Hermosa (Tabla 1). Las características macro y microscópicas de los cultivos aislados fueron similares a las obtenidas por Caballero *et al.* (2006) en suelos ácidos de los Llanos Orientales. Estos mismos autores indican que la supervivencia de estos microorganismos a pH por debajo de 5,5 es más difícil, no solo por la condición libre de H<sup>+</sup> que desplazan otros iones, sino también porque solo pueden actuar las fosfatasas ácidas producidas por los microorganismos, lo cual limita su crecimiento.

La determinación de la capacidad de solubilización y la selección semicuantitativa de las bacterias con capacidad solubilizadora de fosfato, se realizó basándose en la presencia de halos de solubilización (Figura 1) y en el Índice de Solubilización hallado en medio sólido Pikovskaya. De este modo de los 42 cultivos aislados y purificados, se seleccionaron dos cultivos puros (CC01 y CC02) que presentaron un Índice de Solubilización (IS) mayor a 3 (Tabla 2) considerado aceptable para un microorganismo fosfato solubilizador según Otorola *et al.* (2003).

Así mismo, la observación microscópica de estos bacilos seleccionados orientan a la posibilidad de que estas bacterias pertenezcan al género *Salmonella*, lo cual se corrobora con la diversidad de *Pseudomonas fluorescens* en la rizosfera de arroz

(*Oryza sativa* L.) y de plátano (*Musa* spp.) se aislaron 443 cepas, de las cuales solo 80 mostraron la capacidad de solubilizar fosfato, todas estas cepas usaron como fuente de carbono a la dextrosa, galactosa, manosa y citrato; y en cuanto al análisis filogenético realizado se concluyó que las cepas pertenecían a las especies de *P. monteilii*, *P. putida*, *P. plecoglossicida*, *P. fluorescens*, *P. fulva*, *P. mosselii* y *P. aeruginosa* (Naik, *et al.*, 2008).

Las bacterias súper solubilizadoras de fósforo fueron aisladas de muestras agrícolas, lo cual discrepa con el estudio realizado por Agrawal *et al.* (2015), en donde se aislaron 24 cepas de *Pseudomonas putida* a partir de suelos tanto agrícolas como no agrícolas en Chhattisgarh (India), entre ellos varios suelos de cultivo de arroz, mostrando todas ellas capacidad de solubilizar fosfatos, abarcando un rango entre 687.11 y 57.38 µg/ml de fosfato solubilizado, mostrando con ello la capacidad de adaptabilidad a diversos nichos, convirtiéndose muchas de estas cepas en importantes bioinoculantes empleados para mejorar el estado nutricional de diversos suelos agrícolas favoreciendo el crecimiento de las plantas.

## CONCLUSIONES

Se aisló y seleccionó cultivos bacterianos con Índice de Solubilización mayor a 3, a partir de suelo rizosférico de *Theobroma cacao*.

La comunidad bacteriana rizosférica asociada al cultivo de *Theobroma cacao* de las provincias de Bagua y Utcubamba es diversa, sin embargo prevalecen las bacterias Gram negativas.

Los aislados bacterianos CC01 y CC02 poseen características macro y microscópicas diferentes constituyendo potenciales candidatos para la formulación de bioinoculantes.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal T., Kotasthane A.S. y Kushwah R. (2015). Genotypic and phenotypic diversity of polyhydroxybutyrate (PHB) producing *Pseudomonas putida* isolates of Chhattisgarh región and assessment of its phosphate solubilizing ability. *Biotech* 5:45-60.
- Alori E.T., Glick B.R. y Babalola O.O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Front Microbiol* 8:1-8.

- Caballero T., Camelo M., Bonilla R. y Martínez M. (2006). Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfato a partir de suelos algodoneros, departamentos de Cesar y meta. (Trabajo de grado). Programa de Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.
- Gouda S., Kerry R.G., Das G., Paramithiotis S., Shin Han-Seung y Patra J.K. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiol Res* 206:131-140.
- Mehnaz S., Baig D.N. y Lazarovits G. (2010). Genetic and Phenotypic Diversity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria Isolated from Sugarcane Plants Growing in Pakistan. *J Microbiol Biotechnol* 20(12):1614-1623.
- Mehnaz S., Weselowski B., Aftab F., Zahid S., Lazarovits G. y Iqbal J. (2009). Isolation, characterization, and effect of fluorescent pseudomonads on micropropagated sugarcane. *Can J Microbiol* 55:1007-1011.
- Moreno D., Manzano J., López A. (2010). Métodos para identificar, diagnosticar y evaluar el grado de eutrofia. *Contacto S* 78:25-33.
- Naik P., Raman G., Narayanan K., Natarajan N. (2008). Assesment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. *BCM Microbiology* 8(230):1-14.
- Otalora, J., M. Patiño, M. Martínez y A. Pedroza. (2003). Estandarización de prueba para la detección de fosfatasa producida por bacterias solubilizadoras de fosfatos. (Trabajo de grado). Programa de Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Patiño C. (2010). Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del Valle del Cauca. Estudio de Biodiversidad y Eficiencia. (Trabajo de tesis doctoral). Universidad Nacional de Colombia. Colombia.
- Salimpour S., Khavazi K., Nadian H., Besharati H. y Miransari M. (2010). Enhancing phosphorous availability to canola (*Brassica napus* L.) using P solubilizing and sulfur oxidizing bacteria. *Aust. J. Crop Sci* 4(5):330-334.
- Sashidhar B., Podile A.R. (2010). Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct axidation pathway involving glucose dehydrogenase. *Appl Microbiol* 109:1-12.
- Vance C.P., Uhde-Stone C. y Allan D.L. (2003). Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol* 157:423-447.
- Vyas P., Gulati A. (2009). Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC Microbiol* 9:174.
- Walpolo B.C. y Yoon Min-Ho. (2012). Prospectus of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus availability in agricultural soils: A review. *Afr J Microbiol Res* 6(37):6600-6605.