

# **AISLAMIENTO DE BACTERIAS PRESENTES EN EL SUELO DE CULTIVO DE CACAO IMPACTADO CON UNA CONCENTRACIÓN DE CADMIO A 18 ppm.**

POR: WALTER JOAN PRADA MONSALVE  
[walterjoan@gmail.com](mailto:walterjoan@gmail.com)

## **RESUMEN**

El cultivo de cacao es de gran importancia no solo en Colombia sino en el mundo. Según Fedecacao, Santander es el departamento con mayor producción de cacao, un hecho que invita a revisar el estado de los suelos y que microorganismos pueden estar presentes para tratar de replicarlo en otras partes. Sin embargo, hay una preocupación incluso a nivel mundial por la concentración de cadmio en los suelos, de hecho, el suelo tomado para el estudio, presenta una concentración de cadmio del 18 ppm. Esto afecta el crecimiento de algunos microorganismos, pero otros, lo utilizan generando procesos de biorremediación de los suelos. Es así como se quiere aislar el o los microorganismos presentes en la muestra, con el fin de obtener un cultivo axénico. Para ello, se emplearon varios medios de cultivo, en aras de revisar en primera instancia, el comportamiento y el nivel de crecimiento de acuerdo a la concentración del inóculo empleado. Es así como se sabe que el microorganismo aislado es fijador de nitrógeno y solubilizador de fosfatos, es por ello que una batería bioquímica como API20E no es efectiva para la identificación de este tipo de microorganismos. Hay otras pruebas o baterías bioquímicas que pueden contribuir con la identificación de la cepa. Además, se considera necesario repetir la prueba de caldo nitrato pues no son congruentes unos resultados respecto a otros obtenidos en los agares.

## **ABSTRACT**

The cultivation of cacao is of great importance not only in Colombia but in the world. According to Fedecacao, Santander is the department with the largest production of cocoa, a fact that invites to review the state of the soil and that microorganisms may be present to try to replicate it elsewhere.

However, there is a concern even worldwide for the concentration of cadmium in soils, in fact, the soil taken for the study, has a cadmium concentration of 18%. This affects the growth of some microorganisms, but others, use it to generate processes of bioremediation of the soils. Thus it is desired to isolate the microorganism (s) present in the sample, in order to obtain an axenic culture. For this purpose, several culture media were used, in order to review in the first instance, the behavior and the level of growth according to the concentration of the inoculum used. Thus it is known that the isolated microorganism is nitrogen fixer and phosphate solubilizer, that is why a biochemical battery as API20E is not effective for the identification of this type of microorganisms. There are other tests or biochemical batteries that can contribute to the identification of the strain. In addition, it is considered necessary to repeat the nitrate broth test because results are not congruent with respect to others obtained in the agars.

## **INTRODUCCION**

El cultivo de cacao tiene gran importancia a nivel mundial por la economía que gira en torno a este producto vegetal, sin embargo, de acuerdo a FEDECACAO, Santander continua en el primer puesto de producción de cacao en Colombia, llegando a cosechar 22.117 toneladas en el año 2016 (FEDECACAO, 2017).

Para el cultivo del cacao, el suelo juega un papel fundamental, pues si no cumple con las características requeridas, aun cuando la semilla sea de muy buena calidad, no va a generar los beneficios esperados.

Infortunadamente, por distintas circunstancias, se pueden encontrar metales

pesados como cadmio, berilio, arsénico, cromo, cobre, zinc, plomo, selenio, níquel y/o mercurio, que afectan el suelo, algunas veces de manera negativa y otras de forma positiva. A pesar de eso, el uso de fertilizantes de base fosfato, pueden generar mayores concentraciones de cadmio en el suelo, lo que puede desencadenar en un mayor impacto evidenciado por cambios de pH, bajo contenido de materia orgánica, poca retención de agua, aumento en la salinidad, deficiente drenaje y síntomas de erosión (IICA, Abimbola Abiola, 2016).

Un claro ejemplo de esta problemática se evidencia en el suelo a analizar, del cual se va a aislar un microorganismo de interés para posteriormente en otros estudios, identificarlo plenamente. El suelo suministrado por el laboratorio es un suelo con una concentración de cadmio de 18 ppm, extraído de un cultivo de cacao cuyo suelo permanece a la sombra.

Así pues, lo primero que se puede evidenciar es que el suelo excede en demasía los niveles establecidos por la Unión Europea y gran parte de América Latina, que instauran un máximo de 1,6 ppm para el cacao y sus subproductos, sin embargo la muestra analizada para aislar el microorganismo, tiene una concentración más elevada, lo que significa que es muy factible encontrar residuales de cadmio en los productos del cacao, además, estas concentraciones tan altas, pueden alterar a los microorganismos como Salmonella, en el proceso respiratorio, mientras que otras como Staphylococcus aureus, presentan resistencia al cadmio (Vargas, Álvarez, & Cervantes, 1998).

Pero en la naturaleza los microorganismos no se encuentran puros, es decir, axénicos; por el contrario, se va a tener en primera instancia un cultivo mixto, por lo que se hace necesario realizar diluciones seriadas, con el fin de disminuir la concentración de microorganismos presentes y de esta manera, aislarlo artificialmente en laboratorio.

Existen diversos medios de cultivo que permiten el crecimiento o identificación de una serie de microorganismos específicos, así como también agares que admiten el desarrollo de toda la flora microbiana, como el agar nutritivo que no presenta inhibidores del desarrollo bacteriano siendo ideal para

microorganismos poco exigentes. Todo ello obedece a que se pretende simular las condiciones ideales o con las que el microorganismo contaba en su hábitat.

De este modo, cuando se piensa en el aislamiento de microorganismos provenientes de un suelo como el del cacao, se tienen en cuenta medios de cultivo selectivos. Un ejemplo de este tipo de agares es Ashby, que es empleado para especies de azotobacter que pueden usar manitol y nitrógeno atmosférico como fuente de carbono y nitrógeno respectivamente.

Sin embargo, no es el único, pues comercialmente se encuentran otros como NFB cuya especificidad gira en torno a azospirillum, permitiendo el aislamiento de bacilos Gram negativos con movilidad en forma de espiral. El agar Burk se usa también para azotobacter, que presenta una fuente importante de sales inorgánicas y carbohidratos, pero al igual que Ashby, no tiene nitrógeno, y permite evidenciar además un crecimiento mucoso de la colonia.

A diferencia de los demás medios, el Pk o Pikovskaya se emplea para el aislamiento de microorganismos solubilizadores de fosfato, debido a que estos juegan un papel muy importante en la corrección del equilibrio de fósforo de las plantas del cultivo en estudio.

Por otro lado, como se trata de microorganismos que solubilizan nitrógeno, se realizan siembras específicas para estas bacterias, como es el caso del caldo nitrato, empleado para evidenciar la presencia de enzimas nitrato reductasa o nitrito reductasa. Para ello, el medio incubado se somete a la reacción de un reactivo revelador denominado Griess-Ilovaics. Este es un medio diferencial, ya que se evidencian los microorganismos gram negativos por la presencia de la enzima nitrato reductasa y la formación del compuesto diazoico generado entre los nitritos y los reactivos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Una vez recibido en el laboratorio la muestra de tierra húmeda proveniente de un cultivo de cacao que está a la sombra, y con una concentración de cadmio de 18 ppm, se

realiza dilución de 1 gramo de tierra en 9 ml de agua peptonada y con esta solución, se realiza dilución seriada hasta 10<sup>-4</sup> (1:10000) como se muestra en la imagen 1.

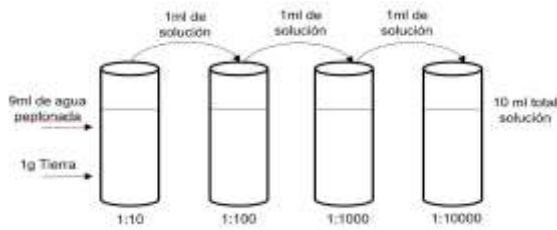
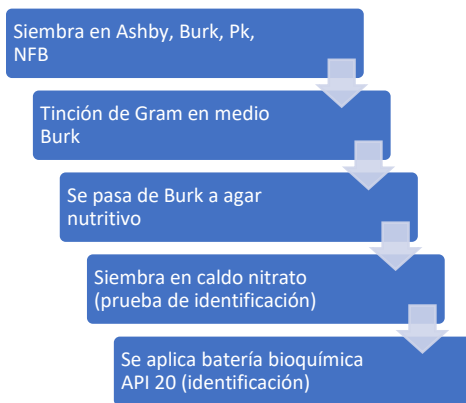


Imagen1. Dilución de la muestra patrón a concentración 1:10(10<sup>-1</sup>) seguida de dilución seriada hasta concentración de 1:10000 (10<sup>-4</sup>)

En la siguiente gráfica se muestra a modo general la metodología requerida para el aislamiento en cultivo axénico del microorganismo de interés a partir de suelo con concentración de cadmio de 18 ppm, que se hallaba a la sombra en cultivo de cacao, una vez obtenida la dilución seriada de la tierra en agua peptonada.



## RESULTADOS

Una vez realizadas las siembras de cada dilución en los diferentes medios de cultivo como Ashby, Burk, Pk y NFB, se realiza un cuadro comparativo (tabla 1) de los resultados obtenidos, resaltando en rojo las concentraciones y la siembra de la muestra de suelo contaminado con 18 ppm de cadmio y que se encuentra en la sombra en el cultivo de cacao.

Tabla 1. Comparación de resultados de crecimiento en diferentes medios de cultivo a distintas concentraciones del inóculo, con variación de en la concentración de cadmio y si el suelo estaba expuesto al sol o a la sombra. Se resalta en rojo el microorganismo de estudio del suelo con 18 ppm de cadmio y que se encuentra a la sombra en el cultivo de cacao.

Medio de cultivo	Dilución	Cadmio ppm	Sombra	So l	Crecimiento a 20 horas
ASHB Y	10 <sup>-1</sup>	0,9	X		Negativo
	10 <sup>-2</sup>	18	X		Positivo
	10 <sup>-3</sup>	0,9		X	Positivo
	10 <sup>-1</sup>	18		X	Positivo
BURK	10 <sup>-3</sup>	0,9	X		Positivo
	10 <sup>-3</sup>	18		X	Positivo
	10 <sup>-2</sup>	0,9		X	Positivo
	10 <sup>-4</sup>	18	X		Positivo
PK	10 <sup>-1</sup>	0,9		X	Positivo
	10 <sup>-2</sup>	0,9	X		Positivo
	10 <sup>-3</sup>	18	X		Positivo
	10 <sup>-3</sup>	18		X	Negativo
NFB	10 <sup>-1</sup>	0,9		X	Positivo masivo
	10 <sup>-1</sup>	0,9	X		Positivo masivo
	10 <sup>-1</sup>	18	X		Positivo masivo
	10 <sup>-4</sup>	18		X	Negativo

Una vez obtenidos los resultados anteriores, la cepa es aislada de Burk a Agar nutritivo. Al verificar la siembra a las 24 horas, y observarse crecimiento, se procede a aislar una vez más en los distintos medios de cultivo, obteniendo los resultados referenciados en la tabla 2.

Tabla 2. Cambios en los medios de cultivo y descripción macroscópica de lo observado, transcurridas 24 horas de la siembra.

Medio de cultivo	Antes de la siembra	Después de la siembra	Características macroscópicas
AGAR NUTRITIVO			Colonia de consistencia mucoide, convexa, de borde continuo, superficie lisa y translúcida no pigmentada.
AGAR NFB			Colonia de consistencia mucoide, convexa, borde continuo, superficie lisa, se asemeja a una gota de agua. Es translúcida no pigmentada. El medio de cultivo cambia de color.
AGAR PK			Colonia de consistencia mucoide, mamelonada, borde no diferenciados en algunas partes y en otras es continuo, superficie lisa, es translúcida no pigmentada. El medio de cultivo cambia de color.
AGAR BURK			Colonia de consistencia mucoide, convexa, borde ondulado, superficie lisa, translúcida no pigmentada.

Posterior a esto, se realizó la prueba de caldo nitrato y API 20E. cuyos resultados se muestran en la imagen 2 y la tabla 3 respectivamente.

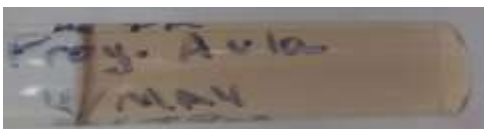


Imagen 2. Caldo nitrato negativo evidenciado por la coloración rosada-rojiza del medio al adicionar el polvo de zinc.

Tabla 3. Resultados de la prueba API 20E. Para cada una de las pruebas, se marca positivo (P) o negativo (N).

O	A	L	O	C	H	U	T	I	V	G	G	M	I	S	R	S	M	A	A
N	D	D	D	T	2	R	D	D	P	E	L	A	O	O	H	A	E	M	R
P	H	C	C		S	E	A			L	U	N		R	A	C	L	Y	A
G																			
N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N



## ANÁLISIS DE RESULTADOS

Respecto a los resultados consignados en la tabla 1, el crecimiento en los 4 medios de cultivo en general fue bueno, sin embargo, en NFB con una dilución de 10-1 se evidenció crecimiento masivo. En los demás medios, se concluyó que la mejor concentración era 10-3 ya que fue la que presentó crecimiento uniforme para los medios de cultivo.

El crecimiento en NFB es indicador posible de azospirillum. Sin embargo, al realizar una comparación con la muestra aislada, azospirillum según bibliografía consultada, crece con movilidad en forma de espiral y no mucoide. Sin embargo, hay una acidificación del medio, generando que vire el color a azul.

Para el caso del agar Pk, se utiliza para la detección de bacterias solubilizadoras de fosfato en el suelo. El extracto de levadura en el medio proporciona nitrógeno y otros nutrientes necesarios para apoyar el crecimiento bacteriano. La dextrosa actúa como fuente de energía y las diferentes sales y extracto de levadura apoyan el crecimiento de los microorganismos. Así pues, las bacterias solubilizadoras de fosfato crecen en este medio formando una zona clara alrededor de la colonia como se observa en la imagen de la tabla 2, debido a la solubilización del fosfato a los alrededores de la colonia. Es por ello que se sabe que el microorganismo es solubilizador de fosfato.

El medio de cultivo Burk, contiene sales inorgánicas junto con fuente de carbohidratos, pero carece de fuente de nitrógeno. Las bacterias fijadoras de nitrógeno son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico y crecen como se evidencia el crecimiento de la imagen de la tabla 2.

Sin embargo, los datos anteriormente suministrados, no concuerdan con la prueba de caldo nitrato, pues el reporte fue negativo y los agares indican que si es solubilizadora de nitrógeno.

Finalmente, la prueba API 20E dio negativo en sus distintos resultados, lo que indica que esta no era la batería bioquímica que se debía usar. Es necesario aplicar otra que sea más acorde a dichos resultados. El hecho de que

solamente un resultado de la API 20E sea positivo, es indicador de que el microorganismo es fermentador y oxida el inositol.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados observados, fue posible aislar en cultivo axénico el microorganismo en estudio. Sin embargo, es importante realizar más pruebas que permitan identificar la cepa de estudio.

Es de notar que, para la cepa aislada, el cadmio no afectó su crecimiento, prueba de ello es que, en uno de los medios de cultivo a una concentración alta, generó un crecimiento masivo en el medio.

Hay otras pruebas o baterías bioquímicas que pueden contribuir con la identificación de la cepa. Además, se considera necesario repetir la prueba de caldo nitrato pues no son congruentes unos resultados respecto a otros obtenidos en los agares.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Britania Lab. (20 de Noviembre de 2014). *Britania Lab*. Obtenido de Britania Lab: [http://www.britanialab.com/productos/179\\_hoja\\_tecnica\\_es.pdf](http://www.britanialab.com/productos/179_hoja_tecnica_es.pdf)
- FEDECACAO. (2017). *FEDECACAO*. Obtenido de FEDECACAO: <http://www.fedecacao.com.co/portal/index.php/es/2015-02-12-17-20-59/nacionales>
- Herrera Marcano, T. (2016). La contaminación con cadmio en suelos agrícolas. *Comité Editorial de Venesuelos, 2*.
- IICA, Abimbola Abiola. (11 de Noviembre de 2016). Mejores prácticas para la remediación de suelos impactados por cadmio y otros metales pesados. *El cadmio en cacao – importancia, experiencias y soluciones*. San José, San José, Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la agricultura.

- Universidad Central de Venezuela (2012). UCV. Obtenido de UCV: [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/nitratos.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/nitratos.pdf)
- Universidad Nacional autonoma de Mexico (2013). UNAM. Obtenido de Sitio web UNAM: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/arc/hivero/U3c\\_PruebasBioquimicas\\_17461.PDF](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/arc/hivero/U3c_PruebasBioquimicas_17461.PDF)
- Vargas, E., Álvarez, Á. H., & Cervantes, C. (1998). Sistemas bacterianos de expulsión de metales tóxicos. *Revista Latinoamericana de microbiología*, 61. Obtenido de <https://books.google.com.co/books?id=mjaaAAAAIAAJ&lpg=PA61&ots=O>

AuykWur0B&dq=bacterias%20y%20c  
admio&pg=PA61#v=onepage&q&f=fa  
lse

#### Otras páginas web consultadas:

- <http://aulavirtual.usal.es/aulavirtual/demos/microbiologia/unidades/LabV/API/api.html>
- <http://www.ugr.es/~cjl/practica%20fijas%20nitrogeno.pdf>
- [http://ec.europa.eu/environment/life/project/Projects/index.cfm?fuseaction=home.showFile&rep=file&fil=CROPS-FOR-BETTER-SOIL\\_formation-5.pdf](http://ec.europa.eu/environment/life/project/Projects/index.cfm?fuseaction=home.showFile&rep=file&fil=CROPS-FOR-BETTER-SOIL_formation-5.pdf)
- <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2006/fas364a/doc/fas364a.pdf>