



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Estudio de la diversidad microbiana
asociadas a suelos cacaoteros con
presencia de cadmio (Cd) y evaluación de su
potencial biorremediador**

Pedro Felipe Feria Cáceres

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Biociencias
Medellín, Colombia
2021

Estudio de la diversidad microbiana asociadas a suelos cacaoteros con presencia de cadmio (Cd) y evaluación de su potencial biorremediador

Pedro Felipe Feria Cáceres

Tesis o trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Doctor en Biotecnología.

Directora:

Bacterióloga y Laboratorio Clínico, Doctorado en Ciencias

Claudia Ximena Moreno

Codirector:

Ingeniero Agroindustrial, Doctorado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Lucas Penagos Vélez

Línea de Investigación:

Biorremediación

Grupo de Investigación:

Microdiversidad y bioprospección

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2021

A Dios, por permitirme descubrir y documentar nuevo conocimiento.

A mi padre Hernando, a mis hermanos Carlos y Alex, quienes descansan en paz, forjaron, con su ejemplo de vida, carácter resiliente para afrontar los momentos difíciles.

A mi madre Fidelia, quien me inculcó que la disciplina y constancia son fundamentales para cumplir sueños.

A mi esposa Amanda, por su paciencia y apoyo incondicional.

A mis hijos Carlos y David, por su comprensión y motivación a seguir adelante.

Algunas personas quieren que algo ocurra, otras sueñan con lo que pasará, mientras otras hacen que suceda

Michael Jordán.

Agradecimientos

No basta esta página para agradecer a todas las personas que directa e indirectamente han contribuido a realización de esta tesis doctoral, cuya ardua labor implicó varios años de investigación. Solo espero a continuación reconocer brevemente a todos los que aportaron de una u otra forma.

En primer lugar, agradecer a la Compañía Nacional de Chocolates como entidad aportante, en especial al Ingeniero Conrado Mora, Gerente Calidad e I&D quien, con su visión de investigador, apostó por llevar a cabo esta investigación. A la doctora Ángela Jaramillo, directora DHO de la Compañía, quien con su valioso apoyo se logró el auxilio educativo para el pago de las matrículas; al Ingeniero Lucas Penagos, Jefe I&D de la Compañía, con quien se logró construir este proyecto, con sus recomendaciones y aportes se logró cumplir los objetivos. Por parte del alma matter, un agradecimiento especial a la profesora Claudia Ximena Moreno quien, con sus recomendaciones, metodología y experiencia, se logró demostrar que la ecología microbiana como base piramidal de la naturaleza puede ser una alternativa de innovación.

A mi familia y amigos, quienes estuvieron ahí, con palabras de aliento y siempre recordando capacidad de resiliencia que hay que tener cuando se trabaja y estudia al mismo tiempo; A mi padre Hernando, a Carlos y Alex, mis hermanos mayores, quienes fueron llamados tempranamente por el señor, cuyo ejemplo terrenal mostró que la fe en Dios vence toda dificultad; Mención especial a mi madre Fidelia, por el apoyo incondicional y consejo durante todas las etapas de mi vida; A mis hijos Carlos y David, por el tiempo que les dejé de dedicar por la realización de este sueño.

Finalmente reconocer la enorme contribución de mi esposa Amanda, mi compañera de viaje, quien, durante muchos días y con sus palabras de aliento, me animó a atravesar las dificultades y salir avante cuando las cosas no salían bien.

Resumen general

La contaminación de suelos cultivables por metales pesados es un problema global, su acumulación puede causar efectos tóxicos que afectan la calidad y la seguridad de los productos cosechados, la composición y el funcionamiento de las comunidades bacterianas del suelo. El Cadmio (Cd) es un metal pesado, el cual se encuentra tanto en la corteza terrestre como en las aguas oceánicas, es emitido al ambiente como resultado conjunto de actividades naturales (origen volcánico) como antropogénicas (múltiples actividades industriales). El Cd presente en el suelo puede entrar a la cadena alimentaria a través de las raíces y tejido foliar de las plantas, cuya tasa de translocación y bioacumulación depende de múltiples variables como el tipo de planta y de las características fisicoquímicas de los suelos.

El chocolate y sus derivados provienen de la fruta del árbol *Theobroma cacao L.* (familia *Sterculiaceae*) nativo de la selva tropical, cuya siembra se extiende desde la cuenca Amazónica hasta el sur de México; distintos reportes señalan que el cacao bioacumula el Cd en sus raíces, el cual transloca hacia la parte aérea y se deposita en la mazorca y las almendras, imponiendo serias limitaciones en cuanto a la calidad y seguridad alimentaria. El cacao colombiano, el cual en los últimos años ha tenido gran auge, en especial, por el incremento en las exportaciones de grano y derivados, puede verse afectado por la presencia de Cd en el grano de cacao proveniente de algunas regiones del país.

Por su parte, se conoce que las comunidades bacterianas presentes en los suelos juegan un papel importante en aspectos de las plantas como la nutrición, el estado fitosanitario y el desarrollo de biomasa vegetal. En general, se sabe poco de las comunidades microbianas del cacao y de la microbiota presente en suelos, por lo tanto, como objetivo de esta tesis se planteó el estudiar, en muestras de suelo recopiladas en fincas del municipio de San Vicente de Chucurí (Departamento de Santander) cultivadas con plantaciones comerciales de cacao en presencia de distintas concentraciones de Cd, la filogenia molecular y su microbiota bacteriana con tolerancia asociada a Cd, identificando sus mecanismos de acción y para algunas de estas, determinar el factor de translocación

Estudio de la diversidad microbiana asociadas a suelos cacaoteros con presencia de cadmio (Cd) y evaluación de su potencial biorremediador

del metal a la planta; esta tesis se encuentra enmarcada dentro de la estrategia de investigación de la Compañía Nacional de Chocolates, la cual busca mediante ciencia básica, ahondar en el conocimiento de nuevas técnicas que permitan el mejoramiento de recursos colombianos como lo es el caso del cacao y sus prácticas agrícolas.

En las siguientes páginas, se describe la composición bacteriana de suelos de plantaciones de cacao en un amplio rango de concentraciones de Cd (0.2 a 18 mg/Kg), que se encuentran naturalmente en esta región. Los filos de mayor abundancia relativa en todas las muestras fueron Proteobacteria, Acidobacteriota, Actinobacteriota, Verrucomicrobiota, Myxococcota, Chloroflexi, Plactomycetota, Bacteroidota, Gemmatimonadota, Nitrospirota, Firmicutes y NB1_J y los géneros bacterianos con mayor abundancia relativa (>0.5%), se identificó a *Nitrospira*, *Udaeobacter*, *Haliangium*, *Cupriavidus*, MND1, *Bacillus*, *Kitasatospora*, *Niveibacterium*, *Acidothrmus*, *Burkholderia*, *Acidibacter*, *Terrimonas*, *Gaiella*, ADurb.Bin063-1, *Solibacter*, *Kitasatospora*, *Sphingomonas*, *Streptomyces*, han sido relacionados con procesos de tolerancia a Cd. Para las muestras de estudio se identificó los géneros bacterianos que conforman la comunidad central, los cuales están presentes en todas las muestras como *Nitrospira* sp., *Cupriavidus* sp., *Burkholderia* sp., ADurb.Bin063-1, *Haliangium* sp., *Udaeobacter*, MND1, *Kitasatospora*, *Acidothrmus*, *Acidibacter*, *Streptomyces*, *Gaiella*, *Solibacter* y *Terramonas*, géneros que pueden jugar un papel fundamental en el funcionamiento del ecosistema, siendo indicativos de fenómenos que ocurren en el ambiente.

Por otro lado, en esta investigación se estudió, para doce cepas nativas, su tolerancia e inmovilización de Cd en medio de cultivo líquido (caldo nutritivo) en presencia de dos concentraciones (10 y 15 mg/L Cd). La mayoría de los aislados mostró una curva de crecimiento retardada en presencia de Cd, de acuerdo con los valores μ y K calculados para cada cepa; la capacidad de captura del metal en el medio de cultivo fue caracterizada por microscopía electrónica de transmisión (TEM), reportando dos mecanismos como extracelular (biosorción a nivel de pared celular) e intracelular (precipitación de Cd en citoplasma), dependiendo del tiempo y condiciones de incubación. Los cambios en los grupos funcionales en la superficie celular se analizaron por espectroscopia infrarroja

transformada de Fourier (FT-IR), se identificó diferentes picos a 3275, 1634 y 1531 cm^{-1} (grupo amida I y II), la adsorción indicó que el átomo de nitrógeno puede ser el sitio principal de interacción de Cd por las cepas; otro cambio notado en los picos 914, 1057 y 1636 cm^{-1} , refiere la ampliación y estiramiento de la banda la presencia de grupos C=O; otro cambio interesante en los picos 2958, 2923, 2873, 2852, 1467, 1455 y 860 cm^{-1} , esta región corresponde tanto a estiramientos de grupos C-H y O-H, donde la posibilidad en que los átomos de oxígeno en los grupos hidroxilo de la biomasa celular están envueltos en los procesos de absorción. Los picos en la región 966, 1230 y 1060 cm^{-1} indican la intervención de enlaces fosfato en la biosorción de Cd con la posible producción de fosfato de Cd sobre la superficie celular de la biomasa.

En este trabajo se realizó un bioensayo bajo condiciones controladas de vivero comercial, aplicando algunas cepas nativas en tratamientos combinados con diferentes concentraciones de Cd utilizando semillas de cacao del genotipo CCN51. Los resultados mostraron que, independiente del género bacteriano, la biomasa en la planta de cacao aumenta y la concentración de Cd se distribuyó y bioacumuló en las partes de las plantas. Sin embargo, cierto grado de inmovilización de Cd pudo ocurrir en el suelo, lo que impidió una mayor concentración de Cd en raíz, evitando su translocación a la planta, especialmente cuando el suelo se bioaugmentó con *Klebsiella* sp. (18-4B).

En conclusión, la combinación de diferentes enfoques permitió analizar la microbiota cultivable y no cultivable con características de biosorción y bioprecipitación de Cd, las cuales están presentes en los suelos cacaoteros bajo distintas concentraciones de Cd en el departamento de Santander. Lo anterior proporciona una línea base sobre dicha composición bacteriana, para que en estudios futuros se logre complementar, los microorganismos asociados, sus interacciones y la dinámica para contrarrestar Cd en suelo y aquellos con actividad biotecnológica, que puedan ser alternativas de innovación, desarrollo y fuente de creación de bionegocios, considerarlos como opción de solución de muchos de los problemas causados por el hombre.

Palabras clave: Cacao, cadmio (Cd), suelos, gen ARNr 16S, bacterias.

Study of microbial diversity associated with cocoa soils with presence of cadmium (Cd) and bioremediation potencial evaluation

ABSTRACT

Soils used for food production could have a relatively high naturally occurring concentration of heavy metals, which could affect plant growth, compromise quality and safety of the derived products, and could also impact the soil bacterial community composition and functioning. *Theobroma cacao* L. crops in several neotropical regions produce food and nutrient sources consumed worldwide. A region at the northeastern Colombian Andes (Santander) has extensive *T. cacao* crops to produce cacao for national consumption and for exports. Cadmium (Cd) is a naturally occurring heavy metal toxic at higher concentrations. Cacao crops are able to bioaccumulated Cd in roots and translocate it to the beans, imposing a serious limitation regarding quality and safety. Soils could have very different natural concentrations of Cd.

We present here the bacterial composition of soils cocoa plantations with a wide range of Cd concentrations 0.2 to 18 mg/Kg, found naturally in this region. Microbial community was described by means of 16S rRNA amplicon sequencing analyses, together with culture-dependent methods isolating Cd tolerant strains and soils physicochemical properties were recorded. Results showed that bacterial composition diversity was dominated by Proteobacteria, Acidobacteriota, Actinobacteriota, Verrucomicrobiota, Myxococcota, Chloroflexi, Plactomycetota, Bacteroidota, Gemmatimonadota, Nitrospirota, Firmicutes y NB1_J and did not have significant changes across sample soils with different Cd concentrations. We observed statistically significant differences in beta-diversity correlated with soil properties; moreover, we report the presence of a core community among the samples, dominated by *Nitrospira* sp., *Cupriavidus* sp., *Burkholderia* sp., ADurb.Bin063-1, *Haliangium* sp., *Udaeobacter*, MND1, *Kitasatospora*, *Acidothermus*, *Acidibacter*, *Streptomyces*, *Gaiella*, *Solibacter* and *Terramonas*; genera typically reported in soils with healthy plant cultures and playing fundamental roles in soil geochemical cycles. Culture-dependent techniques allowed the isolation of bacterial strains

tolerating high Cd concentrations up to 120 mg/L for potential Cd biosorption or intracellular sequestration.

Bacteria have been applied for the bioremediation of cadmium-contaminated environments by biosorption or bioaccumulation interactions; this process is considered as a potential eco-friendly alternative. In the present work, twelve cadmium native bacteria tolerant to 2,500 μM CdCl_2 (120 mg/L) isolated in soils of cocoa farms in presence of different levels of Cd selected, to evaluate their Cd tolerance and immobilization using liquid culture medium (Nutritive broth) in the presence of two Cd concentrations (10 and 15 mg/L), most of the isolates shows delayed growth curve in Cd levels. In the study, the ability to Cd capture by native strains in the liquid broth was characterized by Transmission Electron Microscopy (TEM) and changes in the functional groups in cell surface were analyzed by Fourier Transform infrared spectroscopy (FT-IR).

All the genera have been reported in literature with Cd capability properties in different ways; these bacteria revealed, under methodology development, have been two different forms to Cd capture, such extracellular capability (biosorption) and extracellular mechanism (Cd cytoplasm precipitation) in different concentrations, that depended time and incubation conditions. Furthermore, in the greenhouse experiments were carried out applied some strains in combined treatments using CCN51 cacao genotype seeds, grown in soil with different concentrations of Cd. The results showed that cell morphology and functional groups on cell surfaces changed after Cd interaction; regardless of bacteria genera biomass increases in cacao plant and the Cd concentration is distributed, that promoted bioaccumulation in parts of the plants, but certain Cd immobilization degree can occur in soil, preventing the Cd root concentration, which can prevent the translocation to plant, especially when the soil bioaugmentation with *Klebsiella* sp. (18-4B).

In conclusion, these results allow us to elucidate the cultivable and non-cultivable bacterial microbiota present in soil cultivated with cocoa under different concentration of Cd in Santander Region; This will provide a baseline with information for future studies to clarify and complement the associated microorganisms, their interactions to counteract Cd in soil and those bacterial with biotechnological activity, they can be alternatives to influence for lower Cd accumulation in cacao crops.

Keywords: Cacao, cadmium (Cd), soils, RNAr 16S gene, bacteria.

Contenido

Resumen General	IX
Lista de figuras	XII
Lista de tablas	XIII
Introducción.....	8
Capítulo 1	
Resumen.....	21
1. Introducción	24
2. Materiales y métodos.....	27
2.1. Declaración ética	27
2.2. Premuestreo fincas cacaoteras.....	27
2.3. Descripción de muestreo y colección de muestras.....	27
2.4. Caracterización de los suelos en las fincas muestreadas	29
2.5. Ensayos cultivo dependiente.....	29
2.5.1. Aislamiento de bacterias y unidades formadoras de colonia	29
2.5.2. Análisis del espaciador ribosomal intergénico (RISA).....	30
2.5.3. Secuenciación y análisis filogenético.....	30
2.6. Análisis independiente de cultivo	31
2.6.1. Extracción ADN total de suelo y secuenciación de alto rendimiento.....	31
2.7. Análisis estadístico	32
2.8. Secuencias depositadas en Genbank.....	33
3. Resultados.....	34
3.1. Premuestreo realizado	34
3.2. Propiedades fisicoquímicas de las muestras de suelo de fincas elegidas	34
3.3. Diversidad bacteriana a través de ensayos independientes de cultivo	35
3.3.1. Análisis microbiológicos	35
3.3.2. Análisis del espaciador intergénico Ribosomal (RISA)	36
3.3.3. Identificación de aislados con secuenciación del gen ARN ribosomal 16S.....	36
3.4. Diversidad bacteriana a través de ensayos independiente de cultivo.....	41
3.4.1. Visión general de la secuenciación.....	41
3.4.2. Normalización.....	41
3.4.3. Abundancia relativa de ASV's a nivel de filo y género.....	42
3.4.4. Medida de la alfa-diversidad de los suelos.....	44

Estudio de la diversidad microbiana asociadas a suelos cacaoteros con presencia de cadmio (Cd) y evaluación de su potencial biorremediador

3.4.5. Beta-diversidad de las muestras de suelos cacaoteros.....	44
3.4.6. Asociación entre las comunidades bacterianas y propiedades de suelos.....	47
3.4.6.1. Análisis de redundancia (RDA).....	47
3.4.6.2. Heatmap.....	48
3.4.7. Comunidad central.....	49
Discusión	50
Conclusiones.....	62
Capítulo 2.....	63
Resumen	64
1. Introducción.....	65
2. Materiales y métodos.....	68
2.1. Bacterias nativas empleadas	69
2.2. Efecto del cadmio sobre el crecimiento bacteriano	69
2.3. Determinación de Cd removido por las bacterias nativas.....	69
2.4. Estudio TEM y EDX	70
2.5. Análisis de espectros infrarrojos transformada de Fourier (FT-IR)	70
3. Resultados	71
3.1. Evaluación del crecimiento de las bacterias nativas	71
3.2. Bioacumulación de Cd por parte de las bacterias nativas	71
3.3. Microscopía TEM, Energía dispersiva de rayos X (EDX) y espectros FT-IR	72
3.3.1. Resultados Microscopía TEM	72
3.3.2. Espectros EDX	74
3.3.3. Espectros FT-IR.....	81
Discusión.....	88
Conclusiones.....	93
Capítulo 3.....	94
Resumen.....	95
1. Introducción.....	96
2. Materiales y métodos.....	97
2.1. Bacterias nativas empleadas	97
2.2. Vivero empleado	97

2.3.	Diseño experimental.....	98
2.4.	Experimentos en tubete.....	99
2.5.	Muestreo y análisis.....	101
2.6.	Análisis estadístico.....	101
3.	Resultados.....	102
3.1.	Análisis de suelo y niveles de Cd de los insumos empleados en el estudio	102
3.2.	Biomasa de raíz y parte aérea de las plantas de cacao	102
3.3.	Acumulación de Cd en las plantas de cacao, factor de bioconcentración y translocación.....	105
	Discusión.....	110
	Conclusiones.....	113
	Conclusiones y recomendaciones generales.....	115
1.1.	Conclusiones generales.....	115
1.2.	Recomendaciones generales.....	117
	Referencias	118
	Material suplementario	147
	Protocolo de muestreo de fincas cacaoteras	164
	Generalidades para toma de muestras para análisis de tejido vegetal	166

Lista de figuras

Figura 1. Top 10 mundial de países productores de cacao	9
Figura 2. Producción cacao en Colombia.....	10
Figura 3. Concentración de Cd en suelo departamentos cacaoteros de Colombia	13
Figura 4. Mapa geoquímico de Colombia 2018.....	15
Figura 5. Mecanismos de remediación bacteriana.....	16
Capítulo 1	
Figura 1. Recuento de bacterias totales para las muestras de suelo.....	35
Figura 2. Dendograma de las secuencias de genes ARNr 16S de cepas tolerantes a Cd con secuencias de referencia	38
Figura 3. Morfología de las colonias nativas tolerantes a Cd aisladas en suelos cultivados con cacao.....	40
Figura 4. Curvas de normalización para cada una de las muestras analizadas	41
Figura 5. Histograma de la estructura taxonómica a nivel de filo de las comunidades bacterianas del suelo	41
Figura 6. Histograma de la estructura taxonómica de las comunidades de suelo a nivel de género	43
Figura 7. Alfa-diversidad de ASV's para las muestras de suelos analizados.....	44

Figura 8. Análisis agrupamiento jerárquico de los ASV's a nivel de filo.....	45
Figura 9. Análisis de componentes principales (PCoA) de disimilitud Bray-Curtis de los ASV's a nivel de filo.....	45
Figura 10. Gráfica del análisis discriminante lineal (LDA) muestra la diferenciación en el patrón taxonómico de las muestras a nivel de género.....	46
Figura 11. Análisis Redundancia (RDA) entre propiedades de suelo y abundancia de comunidades de suelo.....	47
Figura 12. Heatmap de la correlación Spearman entre las propiedades de suelo y abundancia de comunidades de suelo.....	48
Figura 13. Heatmap muestra el análisis de comunidad central de todas las muestras.....	49
Capítulo 2	
Figura 1. Curvas de crecimiento bacterias nativas.....	72
Figura 2. Imágenes TEM	
Parte 1. Imágenes TEM de <i>Serratia</i> sp. y <i>Exiguobacterium</i> sp	75
Parte 2. Imágenes TEM de <i>Ralstonia</i> sp. y <i>Enterobacter</i> sp.....	76
Parte 3. Imágenes TEM de <i>Lactococcus</i> sp. y <i>Bacillus</i> sp	77
Figura 3. Imágenes TEM	
Parte 1. Imágenes TEM de <i>Burkholderia</i> sp. y <i>Cupriavidus</i> sp.....	78
Parte 2. Imágenes TEM de <i>Escherichia</i> sp. y <i>Klebsiella</i> sp.....	79
Figura 4. Imágenes TEM de las Bacterias nativas <i>Staphylococcus</i> sp. y <i>Dermacoccus</i> sp	80
Figura 5. Espectros EDX de algunas cepas	82
Figura 6. Espectros FT-IR Parte 1, 2 y 3	84-86
Capítulo 3	
Figura 1. Instalaciones y montaje empleado en granja Yariguies	97
Figura 2. Diseño experimental.....	98
Figura 3. Estado inicial del montaje.....	100

Estudio de la diversidad microbiana asociadas a suelos cacaoteros con presencia de cadmio (Cd) y evaluación de su potencial biorremediador

Figura 4. Plantas de cacao de los diferentes tratamientos	100
Figura 5. Comparación del peso seco para cada parte de la planta	104
Figura 6. Concentración de Cd para cada parte de la planta de cacao	107
Figura 7. Estado fisiológico de las plantas de cacao a los distintos tiempos	108
Figura 8. Diferencias fisiológicas entre las plantas sin Cd y con Cd	109
Material suplementario	
Figura S1 (a y b). Dendograma parcial de ITS de bacterias tolerantes a Cd	148
Figura S2. Morfología de colonias aisladas tolerantes a Cd	150
Figura S3. Rayado en placa de la bacteria nativa <i>Dermacoccus</i> sp	156
Figura S4. Imágenes TEM y EDX para la bacteria de referencia <i>Cupriavidus metallidurans</i> DSM 2839	158
Figura S5. Resumen muestreo suelos	162
Figura S6. Sitio muestreo árbol cacao	163
Figura S7 y S8. Informes de algunos resultados análisis de suelo	165
Figura S9 y S10. Informes de algunos resultados análisis de material vegetal	168

Lista de tablas

Tabla 1. Concentraciones de Cd en almendra de cacao en los principales países productores de cacao	11
Tabla 2. Microorganismos empleados en procesos de bioremediación	16
Capítulo 1	
Tabla 1. Descripción de los sitios de estudio	28
Tabla 2. Adaptadores usados para cada muestra	32
Tabla 3. Identificación taxonómica de las bacterias tolerantes a Cd aisladas	37
Tabla 4. Resumen de las 35 cepas tolerantes a Cd aisladas e identificadas	39
Capítulo 2	
Tabla 1. Homología de las secuencias ADNr 16S de las bacterias nativas tolerantes	68
Tabla 2. Parámetros de crecimiento bacteriano.....	71
Tabla 3. Capacidad de bioacumulación de las bacterias nativas en caldo nutritivo	73
Tabla 4. Cambios en el número de onda (cm^{-1}) para las bacterias nativas analizadas	83
Tabla 5. Identificación de grupos funcionales de la pared celular	87
Capítulo 3	
Tabla 1. Efecto de la inoculación de las bacterias nativas sobre la biomasa	103
Tabla 2. Concentración de Cd y factores para los tratamientos de estudio.....	106
Material suplementario	
Tabla S1. Composición de los medios de cultivo empleados.....	158
Tabla S2. Formato de Recopilación datos fincas cacaoteras.....	159
Tabla S3. Propiedades de suelos de las fincas cacaoteras	160
Tabla S4. Matriz de correlación entre las propiedades de suelo fincas cacaoteras seleccionadas.....	161

Introducción

La contaminación de suelos cultivables con cadmio (Cd) representa una amenaza para la seguridad alimentaria mundial por su facilidad de absorción en numerosos tipos de cultivo, incluyendo cereales, tubérculos y frutas. Este metal pesado no cuenta con función metabólica en plantas, pero puede acumularse en raíces, hojas y partes comestibles como granos que, con su ingesta, causa daños severos en la salud de los seres humanos, afectando órganos como pulmones e hígado y eventualmente conducen a la aparición de cáncer y otros trastornos mortales (Mite et al., 2010; Chavez et al., 2015). El Cd presente naturalmente en la corteza terrestre, principalmente en forma de sales, y cuya toxicidad crónica tanto en humanos y medio ambiente ha sido ampliamente documentada, que según la Organización Mundial de la Salud reporta una ingesta diaria máxima de 2.5 mg/Kg. (Zao et al., 2015); El Cd, junto con otros metales pesados, son liberados al ambiente por actividades industriales como electroplateado, elaboración de acero, curtiembres, preservación de la madera, cerámicas, elaboración de vidrio, procesamiento químico y aplicación de fertilizantes; su acumulación a nivel del suelo puede causar la reducción de la fertilidad a través del impacto adverso sobre las comunidades microbianas heterogéneas del suelo (US Department of Health and Human Services, 2008).

El Cd presente en el suelo en diferentes concentraciones transloca a las plantas a través de las raíces y transportado vía xilema hacia el tejido foliar, cuya tasa de transferencia depende de una variedad de factores, que incluyen rata de deposición, tipo de suelo y planta, pH del suelo, contenido de humus, disponibilidad de materia orgánica, tratamiento del suelo con fertilizantes, meteorología y la presencia de otros elementos como el Zinc (Wong and Cobbett, 2009). De acuerdo con la UNEP (United Nations Environment Programm), en su informe emitido en el año 2008, señala que en la mayoría de los países que poseen cultivos agrícolas representan la mayor parte de la ingesta de Cd, es decir,

que la exposición crónica a Cd es un resultado directo del consumo de alimentos derivados de plantas (Jiménez, C. 2015).

El chocolate y sus derivados provienen de la fruta del árbol *Theobroma cacao L.*, que pertenece a la familia *Sterculiaceae*, cuyo cultivo y cosecha cuenta con gran importancia económica a nivel mundial (Chavez et al., 2015). En el mundo se conocen tres variedades de cacao: forastero (*Theobroma cacao sphaerocarpum*), criollo (*Theobroma cacao cacao*) y trinitario (entrecruzamiento entre los dos primeros). Según Ludlow et al., (2014), el origen del árbol *Theobroma cacao* tuvo lugar en las cuencas del Amazonas y Orinoco de Colombia y Venezuela, fue cultivado en América Central por los primeros Mesoamericanos y fue llevado a Europa por Hernán Cortés en 1530. El cacao es un cultivo de importancia económica mundial, que de acuerdo con las cifras publicadas por la FAO (Food and Agriculture Organization) para el año 2019, los principales países cultivadores y productores se encuentran en el continente africano, en especial Costa de Marfil, Ghana, Nigeria y Camerún; en Asia se destaca Indonesia; en Latinoamérica, los mayores productores en su orden son Brasil, Ecuador, Perú, Colombia (noveno lugar en el mundo) y República Dominicana (Figura 1).

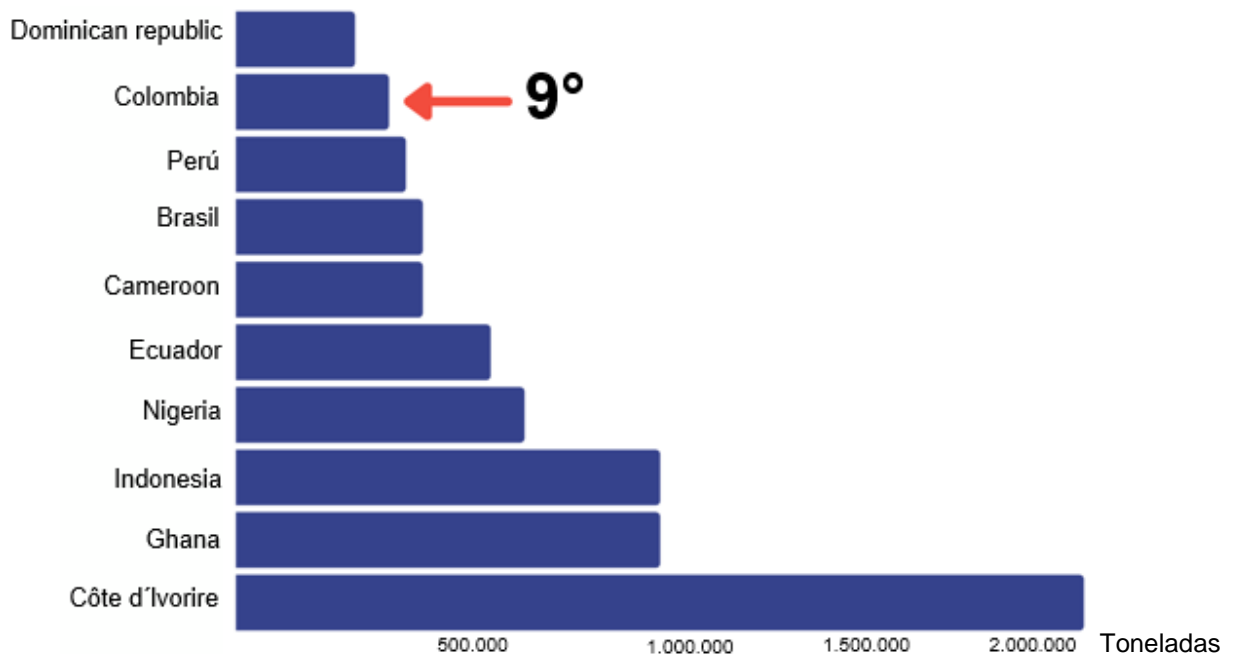


Figura 1. Top 10 Mundial de países productores de cacao (Fuente: http://www.fao.org/faostat/en/?#rankings/countries_by_commodity, 2019.).

Estudio de la diversidad microbiana asociadas a suelos cacaoteros con presencia de cadmio (Cd) y evaluación de su potencial biorremediador

Las cifras reportadas por la FAO coinciden con el gran auge que ha tenido el cacao colombiano en los últimos años, principalmente por el incremento en la exportación de cacao y derivados en respuesta a la necesidad que tienen los productores Norteamericanos y Europeos de poder contar con proveedores diferentes al cacao africano, cuyos países han comenzado a reducir sus cultivos ante la volatilidad de precio del grano, lo que repercute en pérdida de rentabilidad (Jiménez, C. 2015). Es importante señalar que en nuestro país las regiones cultivadas con cacao están distribuidas en todo su territorio, donde existen una amplia variedad de microclimas y condiciones ecológicas heterogéneas, esto hace que la producción de cacao presente alta variabilidad en su porcentaje de grasa (manteca de cacao), contenido en polifenoles y moléculas que confieren perfiles aromáticos (Pabon et al., 2014). De acuerdo con las estadísticas publicadas en la página web del Ministerio de Agricultura respecto al área y producción, del cultivo de cacao en Colombia, señala una importante tendencia en el aumento, tanto en áreas cultivadas como la producción en toneladas (Figura 2).

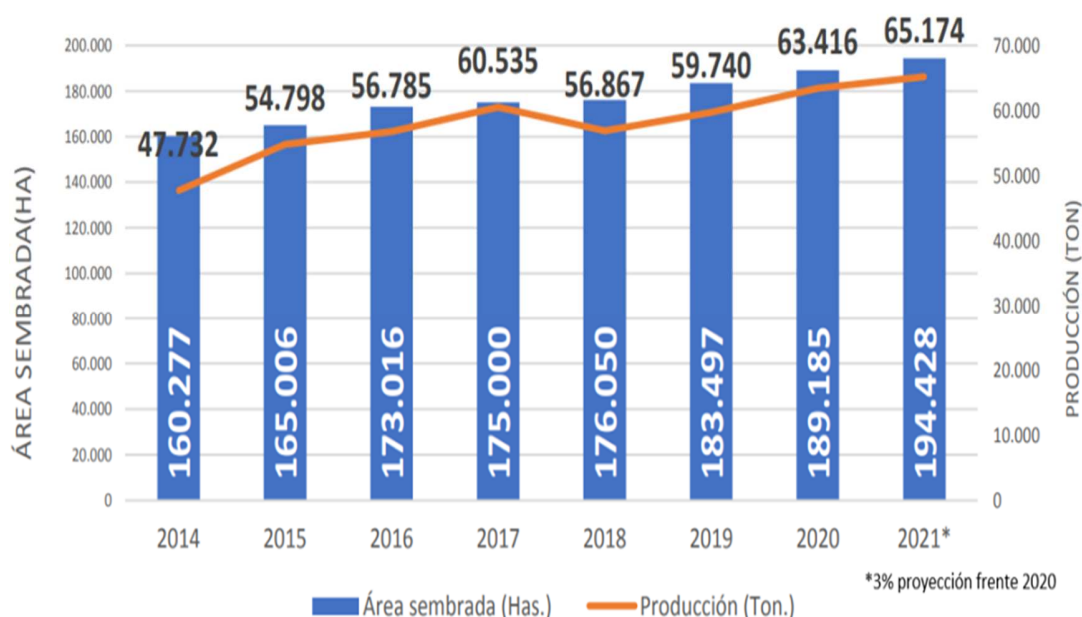


Figura 2. Producción cacao en Colombia. Fuente: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Marzo 2021

En 2018, La Unión Europea anunció la incorporación al reglamento 1881 de 2006 de la regulación 488/2014, donde se especifican los niveles máximos de Cd a cumplir en chocolate y sus derivados, los cuales comenzaron a regir desde enero de 2019 (EU, 2014), con el agravante que el incumplimiento de estas regulaciones tendrá consecuencias económicas y sociales en países con altos niveles de Cd en almendra. En búsqueda de explicar la translocación del metal en la planta de cacao, investigaciones reportadas por Meter et al., (2019) y Chavez et al., (2015), señalan la secuencia de acumulación de Cd en los tejidos de la planta de cacao: Raíces, tallo, hojas, cáscara o cubierta de las semillas y almendra. Esto significa que la almendra de cacao contiene menor porcentaje de Cd, comparado con los otros tejidos de la planta. De acuerdo con Vanderschueren et al., (2021), la concentración de Cd en almendra provenientes de países en Latinoamérica es más alto en comparación con las de otros orígenes, siendo la fuente geogénica de Cd en suelo la que aporta la gran parte de esta concentración. En la tabla 1, se resumen para los 10 países con mayor producción, la concentración de Cd en almendra de cacao.

Tabla 1. Concentraciones de Cd en almendra de cacao en los principales países productores (Fuente: Vanderschueren et al., 2021)

País Origen	Cd en almendra (mg/Kg)		
	Promedio	Variación	n
Costa de Marfil	0.05	0.04	9
Ghana	0.05	0.045 – 0.058	30
Indonesia	0.52	–	1
Nigeria	0.02	0.003	3
Ecuador	2.68	1.26 – 3.92	6
Camerún	0.05	0.01	3
Brasil	0.10	–	1
Perú	0.96	0.34	72
Colombia	12.00	6.94	57
Rep. Dominicana	0.13	0.031	–

Dada la buena reputación del cacao Latinoamericano y principalmente en Ecuador, quien lidera el 35% de las exportaciones de grano, el reporte de alto contenido de Cd en esta matriz, impulsó a varios investigadores ecuatorianos a identificar, desde la especiación

Estudio de la diversidad microbiana asociadas a suelos cacaoteros con presencia de cadmio (Cd) y evaluación de su potencial biorremediador

química del Cd (Chavez et al., 2016), la concentración de Cd en almendras y su relación con el suelo (Chavez et al., 2015), propiedades del suelo y factores agronómicos que afectan la concentración de Cd en grano (Argüello et al., 2019) y la distribución de otros metales trazas en suelo y almendras de cacao (Vanderschueren et al., 2021). De la misma manera, Arévalo-Gardini et al., (2017) publicó la acumulación de metales pesados en hojas y almendras de cacao en Perú. En la mayoría de las publicaciones sugieren que la amplia extensión de Cd en Suramérica podría ser de origen geogénico sin relación con la contaminación antropogénica.

A nivel mundial, la concentración de Cd para suelos agrícolas está determinada y establecida para países como Suiza (0.4 mg/Kg), Dinamarca (0.5 mg/Kg), Unión Europea (1.1 mg/Kg), Canada (1.4 mg/Kg), Reino Unido (1.8 mg/Kg), Bélgica (2.0 mg/Kg), Brasil (3.0 mg/Kg) y Polonia (4.0 mg/Kg) (Carlson et al., 2007; Ding et al., 2018). Respecto a Colombia, aún no cuenta con valores de contenido máximo de Cd permitido en suelos agrícolas, sin embargo, en los últimos años se han publicado investigaciones donde indican que los suelos son de origen volcánico, por ende, la concentración de Cd es mayor que los países productores del continente africano, asiático e incluso en Latinoamérica.

En concordancia a lo anterior, Rodríguez et al., (2019), publicó la modelación de contenido de Cd en cacao usando las propiedades del suelo medidas a varias profundidades en la región central del país (Departamento de Cundinamarca), reportando una concentración de Cd de 10.68 mg/Kg (0–30 Cm) y 7.92 mg/Kg (60–100 Cm); Recientemente Bravo et al., (2021) publicó la primera encuesta de concentración de Cd en suelos cultivados con cacao, en la cual, de acuerdo con la distribución espacial de Cd en suelos con cultivos de cacao empleando escalas de rango de concentración de Cd para identificar puntos calientes y fríos, señala que para Colombia el contenido promedio de Cd es de 1.43 mg/Kg. En figura 3, se resumen la concentración de Cd en suelo para los principales departamentos productores de cacao en Colombia.

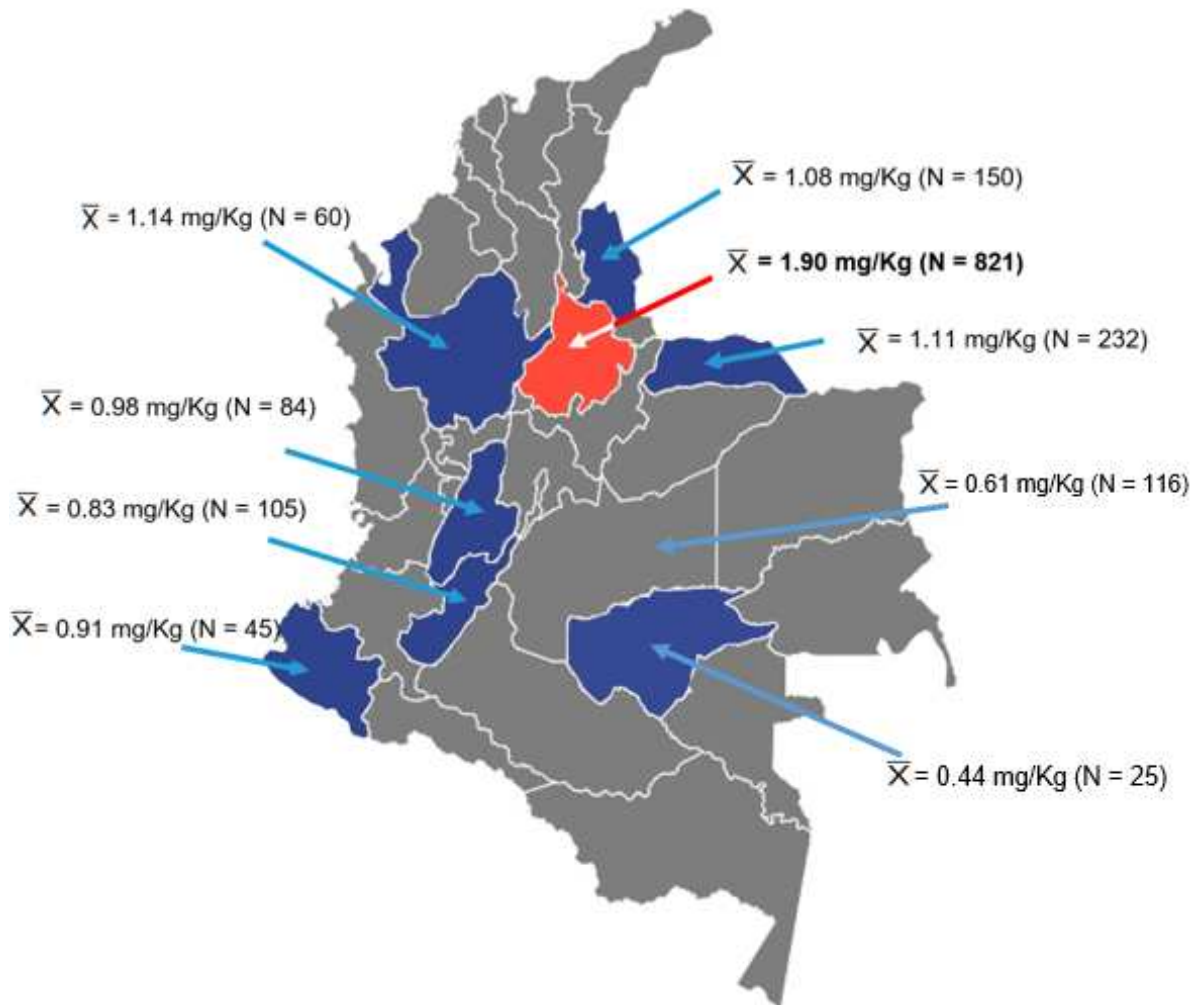


Figura 3. Concentración de Cd en suelos en departamentos cacaoteros de Colombia

Es importante indicar que, en la Compañía Nacional de Chocolates existe el área de compras y fomento agrícola creada en el año de 1958, encargada de incentivar y promover el cultivo de cacao en el país. A lo largo de estos años, ha ejecutado la tarea de impulsar y mejorar su cultivo, a través de apoyo a proyectos productivos, capacitación continua a agricultores y técnicos mediante realización de visitas a fincas y granjas experimentales de la Compañía (ubicadas en los municipios de Támeis y Barrancabermeja), apoyos socio-empresariales, trabajo conjunto con los demás participantes de la cadena de cacao (Por ejemplo con Corpoica, hoy Agrosavia y Fedecacao), suministrando material vegetal e investigación a nivel agronómico.

Estudio de la diversidad microbiana asociadas a suelos cacaoteros con presencia de cadmio (Cd) y evaluación de su potencial biorremediador

Sumado a la promoción del cacao en Colombia, el área de compras y fomento ha adelantado una serie de investigaciones, en las cuales, logró identificar las concentraciones de Cd en almendra en varias regiones del país (mapa de Cd en grano), el mejoramiento de variedades a nivel genético, así como el de promover alternativas de fertilización química de suelos para evitar la absorción de Cd por parte de las plantas de cacao. Dado que el departamento con mayor número de cultivos y cosecha de cacao es Santander (25,148 Toneladas para el año 2019), la compañía ha centrado su interés en validar cual es la concentración de Cd en suelo presente en los principales municipios cacaoteros del departamento; De hecho, en una de las investigaciones publicadas realizadas en sinergia con entidades gubernamentales como Agrosavia y Fedecacao, se reportó una concentración promedio de Cd en suelo para el departamento de Santander de 1.62 mg/Kg +/-1.77 mg/Kg (Pabon, M. et al., 2014), valor ligeramente menor al reportado por Bravo et al., (2021).

En cuanto a las características geoquímicas de los suelos de Santander, según Montaña et al., (2016), el departamento cuenta con suelos que proceden de materiales geológicos de la era cretácica de las formaciones Umir, La Luna y Simití que contienen principalmente lutitas, calizas, areniscas y chert. La presencia de la mayoría de los metales pesados en suelo se asocia a las Lutitas, metales que permanecen en los suelos por la presencia de materiales calcáreos, que le confieren características básicas o pH alto a los mismos, disminuyendo la movilidad de tales elementos. En la Figura 4 se visualiza el mapa geoquímico de Colombia del año 2018, haciendo zoom al departamento de Santander y San Vicente de Chucuri.

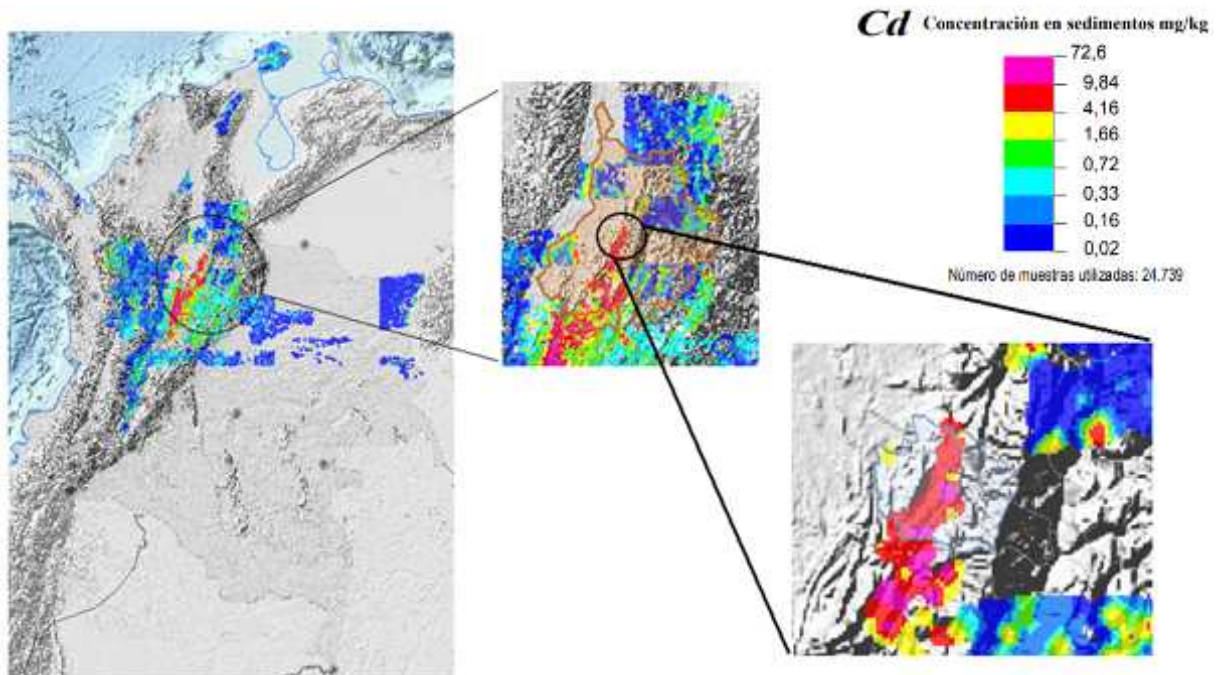


Figura 4. Mapa geoquímico de Colombia 2018, resaltando al departamento de Santander y San Vicente de Chucurí. (Fuente: https://srvags.sgc.gov.co//Archivos_Geoportal/Recursos_Minerales/Atlas_Geoquimico_2018/PDF/9_Cd.pdf).

La presente investigación estudió la diversidad de las comunidades bacterianas asociadas a suelos cacaoteros en presencia de Cd, así como el aislamiento y caracterización de bacterias con tolerancia a Cd con sus mecanismos de acción asociados. Según la FAO: “El suelo es un sistema vivo, cuerpo natural compuesto de materiales meteorizados, materia orgánica, aire y agua, producto final de la influencia del tiempo y combinado con el clima, topografía, organismos (flora, fauna y ser humano)” (FAO web site, 2020). Las bacterias presentes en el suelo pueden presentar un potencial biotecnológico, por su capacidad de interactuar con suelo y plantas, con el objetivo de mejorar la calidad, salud, nutrición y desempeño ambiental del suelo, a su vez de biorremediar suelos degradados o contaminados con metales pesados o residuos petroquímicos.

Existe una amplia variedad de publicaciones que refieren la capacidad de hongos y bacterias para lograr procesos de biorremediación de suelos con presencia de Cd. En la tabla 2, se mencionan algunos microorganismos reportados en dichos procesos.

Estudio de la diversidad microbiana asociadas a suelos cacaoteros con presencia de cadmio (Cd) y evaluación de su potencial biorremediador

Tabla 2. Microorganismos empleados en procesos de biorremediación

Microorganismo	% Captura Cd (mg/g peso seco)	Referencia
<i>Trichoderma asperellum</i>	10.5	Mohsenzadeh and Shahrokhi, 2014
<i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i>	7.0, 5.2	Fazli et al., 2015
<i>Paecilomyces lilacinus</i> M1	24.2	Zeng et al., 2010
<i>Bacillus</i> sp.	12.2	Niu et al., 2011
<i>Pantoea agglomerans</i> UCP1320	38.5	Acioly et al., 2018
<i>Escherichia coli</i> WS11	45.37	Ansari and Malik, 2007

En cuanto a mecanismos de acción de las bacterias frente a Cd, en la figura 5 se resumen los principales, los cuales varían según del género bacteriano. Cepas del género *Enterobacter* sp. se han reportado por su capacidad de secuestrar Cd mediante la producción de exopolisacáridos (Wang et al., 2020), para *Burkholderia* sp. se describe la capacidad de unir Cd a la pared celular (Zhang et al., 2019), *Exiguobacterium* sp. se ha

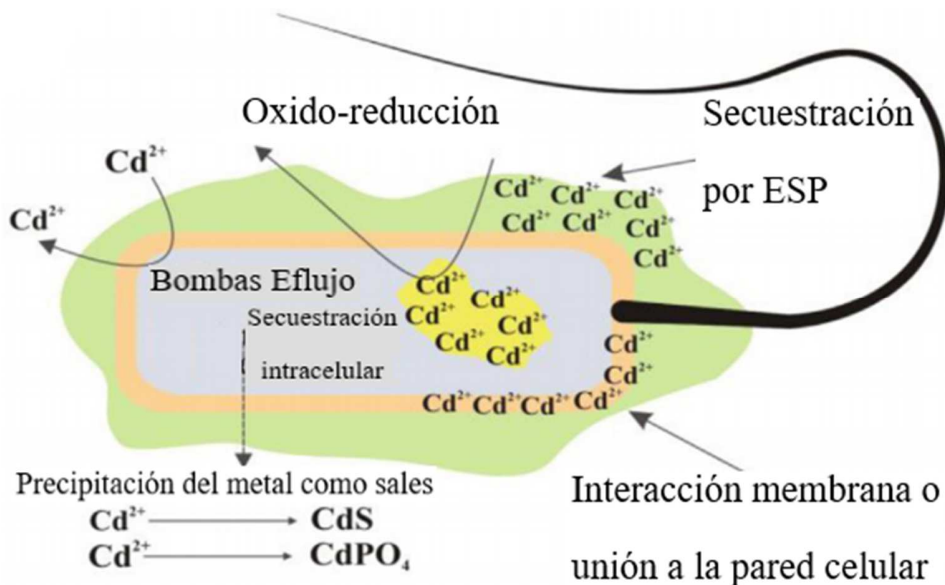


Figura 5. Mecanismos de remediation bacteriana (Kumar et al., 2020)

reportado con la capacidad de precipitar Cd en suelo en forma de sales tipo carbonato (kumari et al., 2014) y para *Klebsiella* sp., se ha reportado la capacidad de bioacumular Cd en el citoplasma (Shamin, S. y Rehman, A., (2012)).

Siguiendo la línea trazada por la Compañía Nacional de Chocolates, la presente investigación estudió una serie de fincas cacaoteras pertenecientes al municipio de San Vicente de Chucurí, municipio conocido como la capital cacaotera de Colombia, el cual cuenta con altos niveles de Cd, no solo en suelo sino en material vegetal como hojas y semillas; es un municipio que cuenta con paisaje de montaña, su vegetación es de bosque húmedo tropical, con temperatura promedio de 24°C y una altitud promedio de 700 metros sobre el nivel del mar, cuyos suelos tienen como principal característica textura arcillosa adecuada para labores de agricultura y ganadería, tiene una extensión de 1185,26 Km², limita al norte con Barrancabermeja y Betulia, al Oriente con Zapatoca y Galán al sur con Carmen y al oeste con Simacota y Barrancabermeja, con cerca de 12.000 hectáreas cultivadas con cacao (Ministerio de agricultura, 2018). Luego de realizar un muestreo, se seleccionó 4 fincas teniendo en cuenta las propiedades del suelo como pH y nivel de Cd total para los pasos posteriores de la presente investigación, la cual busca caracterizar las comunidades bacterianas asociadas a suelos cacaoteros con presencia de Cd y evaluar el mecanismo de acción de algunos microorganismos aislados, tanto a nivel laboratorio como en un bioensayo en vivero comercial.

Estudio de la diversidad microbiana asociadas a suelos cacaoteros con presencia de cadmio (Cd) y evaluación de su potencial biorremediador

Hipótesis

En suelos de las fincas cacaoteras del municipio de San Vicente de Chucuri con presencia de cadmio geogénico, se encuentran presentes poblaciones de bacterias nativas, las cuales cuentan con mecanismos de acción que permiten la tolerancia al metal pesado, y están asociados con retener y evitar la translocación de cadmio a las plantas de cacao.

Objetivos de la investigación

Objetivo general:

Estudiar la diversidad de las comunidades microbianas asociadas a suelos cacaoteros en presencia de Cd y evaluar el potencial de biorremediación en algunos microorganismos aislados, tanto a nivel laboratorio como en bioensayos en invernadero.

Objetivos específicos:

1. Estudiar las comunidades bacterianas presentes en suelos contaminados con Cd, usando técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS), su correlación con propiedades del suelo e identificación molecular de bacterias nativas tolerantes a altas concentraciones de Cd.
2. Evaluar a nivel de laboratorio, la capacidad biorremediadora de Cd de los microorganismos aislados por métodos de microbiología convencional.
3. Comprobar en bioensayo bajo condiciones controladas de vivero comercial, la capacidad biorremediadora de Cd de o los microorganismos aislados.

Estudio de la diversidad microbiana asociadas a suelos cacaoteros con presencia de cadmio (Cd) y evaluación de su potencial biorremediador

Los hallazgos del estudio se desglosaron en tres capítulos y cada uno de ellos se escribió a manera de artículo, contemplando resumen, palabras claves, introducción, materiales y métodos, resultados, discusión y conclusiones.

El capítulo uno relaciona el estudio de la diversidad de comunidades bacterianas asociadas a suelos con distintos niveles de Cd cultivados con cacao y su interacción con las propiedades fisicoquímicas empleando métodos cultivo dependiente, identificación molecular de los aislados, secuenciación de nueva generación (NGS) del gen ARN ribosomal 16S y cuyas preguntas a resolver en la discusión de resultados son: ¿Qué comunidades bacterianas están asociadas a suelos cultivados con cacao en presencia de Cd? ¿Es posible caracterizar bacterias tolerantes con diferentes mecanismos de tolerancia a Cd que pudiesen ser usadas en procesos de biorremediación? ¿Existe correlación entre las propiedades de suelo y las comunidades bacterianas tolerantes a Cd presentes en suelos cacaoteros?

En el capítulo dos se contempla la caracterización y evaluación a nivel de laboratorio de la tolerancia a Cd de las bacterias nativas, indicando el mecanismo de acción empleando técnicas de microscopía TEM. Las preguntas a resolver son: ¿Qué mecanismos de acción frente a Cd cuentan las cepas de bacterias aisladas? ¿Qué porcentaje de Cd logran capturar estas bacterias nativas? ¿Cuáles de estas bacterias nativas cuentan con las mejores tasas de crecimiento en las condiciones evaluadas?

El capítulo tres relata el bioensayo bajo condiciones controladas de vivero comercial, el efecto de 3 bacterias nativas de los géneros *Klebsiella* sp., *Exiguobacterium* sp. y *Enterobacter* sp con capacidad para interactuar y acomplejar Cd en plantas de cacao. Las preguntas a resolver son: ¿Qué género bacteriano cuenta con menor factor de bioconcentración y translocación de Cd a la planta de cacao? ¿Existe diferencia entre los tratamientos planteados en el bioensayo de vivero? ¿Cuál es el orden de bioacumulación de Cd obtenido para cada una de las partes de la planta de cacao?

Capítulo 1

PERFIL METAGENÓMICO Y ANÁLISIS CULTIVO DEPENDIENTE DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA ASOCIADA A SUELOS CULTIVADOS CON CACAO CON PRESENCIA DE CADMIO (Cd) EN COLOMBIA

RESUMEN

Los metales pesados están presentes en los suelos agrícolas de manera natural como componentes o como productos de eventos de contaminación, por ende, las plantas que crecen en dichos suelos están propensas a bioacumular metales pesados en su biomasa; *Theobroma cacao* cuenta con la capacidad de bioacumular cadmio (Cd) en sus estructuras, en especial en las almendras, las cuales pueden estar en productos derivados de chocolate, siendo un riesgo potencial a la salud humana; de acuerdo a lo anterior, la biodegradación de Cd es materia de estudio y una alternativa deseada a nivel técnico y económico. Actualmente para evitar la presencia de Cd en la cadena alimenticia, se seleccionan fincas cacaoteras que exhiben bajas concentraciones de Cd total en suelo, imponiendo serias limitaciones a los agricultores para cumplir normativas internacionales. El estudio de comunidades bacterianas y el aislamiento de bacterias con tolerancia y mecanismos para contrarrestar la translocación de Cd hacia las partes de las plantas de cacao tiene alta relevancia en la economía de Colombia y, en especial, para las compañías productoras de chocolate y sus derivados, por tanto, este estudio pretende explorar las

comunidades bacterianas asociadas con suelos cultivados con cacao en presencia de diferentes niveles de Cd en el norte de Colombia, Suramérica (Departamento de Santander), donde se caracterizó la composición de las comunidades bacterianas por secuenciación de amplicones del gen ARN ribosomal 16S a partir de ADN metagenómico de suelo y el aislamiento de bacterias por técnicas dependientes de cultivo.

Las técnicas de cultivo-dependiente permitieron el aislamiento de bacterias tolerantes a una concentración de 120 mg/L, complementan la información para Colombia y amplía el número de cepas caracterizadas con capacidad adaptativa frente al contaminante con una tolerancia a Cd en concentraciones de 120 mg/L, lo que representa el primer reporte con esta capacidad para *Exiguobacterium* sp., *Ralstonia* sp., *Serratia* sp., *Dermacoccus* sp., *Klebsiella* sp., *Lactococcus* sp. y *Staphylococcus* sp., además de confirmar que existe una mayor diversidad de bacterias tolerantes a Cd presentes en suelos de fincas cultivadas con cacao en Colombia. En cuanto a los resultados de secuenciación masiva, revelaron que, la alfa-diversidad en la composición bacteriana, según el análisis ANOVA, hay diferencias estadísticamente significativas de las comunidades bacterianas presentes en las muestras. Respecto al análisis de correlación Pearson, se encontró que los índices de Shannon y Simpson, cuentan con una correlación positiva frente a MO, C, pH, Mn, C.I.C.E., Ca, P y negativamente correlacionados con S; Con respecto a la estructura de comunidades bacterianas, se realizó un análisis de componentes principales (PCoA) basado en el análisis de permutación múltiple PERMANOVA y disimilitud Bray-Curtis, el cual reveló que independiente de la concentración de Cd presente en las muestras de suelo, las separa de acuerdo con el valor de pH. Los filos de mayor abundancia relativa en todas las muestras fueron Proteobacteria, Acidobacteriota, Actinobacteriota, Verrucomicrobiota, Myxococcota, Chloroflexi, Plactomycetota, Bacteroidota, Gemmatimonadota, Nitrospirota, Firmicutes y NB1_J y los géneros bacterianos géneros bacterianos con mayor abundancia relativa (>0.5%), se identificó a a *Nitrospira*, *candidateus Udaeobacter*, *Haliangium*, *Cupriavidus*, MND1, *Bacillus*, *Kitasatospora*, *Niveibacterium*, *Acidotherrmus*, *Burkholderia*, *Acidibacter*, *Terrimonas*, *Gaiella*, ADurb.Bin063-1, *candidateus Solibacter*, *Kitasatospora*, *Sphingomonas*, *Streptomyces*, han sido relacionados con procesos de tolerancia a Cd. Una vez identificadas las comunidades bacterianas, se realizó análisis de redundancia entre la variación de las comunidades bacterianas identificadas por técnicas dependiente e independiente de cultivo y las variables edáficas de los suelos, donde se encontró su correlación positiva frente a K, MO, C, Ca, pH (p<0.01)

y P, C.I.C.E ($p < 0.05$). Para las muestras de estudio se identificó los géneros bacterianos que conforman la comunidad central, los cuales están presentes en todas las muestras como *Nitrospira* sp., *Cupriavidus* sp., *Burkholderia* sp., ADurb.Bin063-1, *Haliangium* sp., *Udaeobacter*, MND1, *Kitasatospora*, *Acidothermus*, *Acidibacter*, *Streptomyces*, *Gaiella*, *Solibacter* y *Terramonas*, géneros que pueden jugar un papel fundamental en el funcionamiento del ecosistema, siendo indicativos de fenómenos que ocurren en el ambiente. La combinación de diferentes estrategias en esta investigación ofrece nuevas pistas sobre la evaluación de comunidades bacterianas en suelos cultivados con cacao en presencia de alta concentración de Cd geogénico en suelos de Colombia. La investigación aporta conocimiento de la interacción de los componentes del suelo con las comunidades bacterianas en su papel ecológico y su posible contribución en la modulación del efecto de la bioacumulación de Cd en cacao.

PALABRAS CLAVES

Diversidad bacteriana, Cadmio (Cd), suelo contaminado, cacao, Estudio ARN Ribosomal 16S, cacao.

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación con metales pesados es un problema global, representa una amenaza para la vida y el medio ambiente por su alta toxicidad (Chavez et al., 2015). El cadmio (Cd) es un metal pesado asociado con algunos tipos de enfermedades pulmonares, así como náusea, vómito, dolor abdominal, dolor de cabeza y disfunción del riñón (World Health Organization, 2010). En plantas, el Cd ha sido involucrado en fenómenos de apertura de estomas, transpiración y la fotosíntesis. Este metal no tiene función metabólica en plantas, pero puede acumularse en raíces, hojas y partes comestibles como granos (Chavez et al., 2015).

En Colombia, las condiciones ecológicas varían ampliamente y las regiones cultivadas con cacao se extienden por todo su territorio el cual cuenta con microclimas, lo que hace que la producción de cacao presenta alta variabilidad en su composición química (Chaves-López et al., 2014; An, Y., 2004). El clima y las condiciones del ecosistema en las regiones colombianas son extremadamente diversas y las plantaciones de cacao están esparcidas en todo su territorio, lo cual resulta en una alta variabilidad en la composición química de los productos de cacao en cuanto a polifenoles y composición aromática (Chaves-López et al., 2014). La producción de cacao es una industria importante a nivel mundial y en Colombia se produce chocolate fino tipo exportación es producido con variedades Criollo y Trinitario, favorables a las condiciones agroecológicas como clima y humedad, resultando con alta calidad organoléptica y estándar de calidad en mercados competitivos (Porrás et al., 2019).

Theobroma cacao L. es una planta autóctona cultivada en Colombia, recientemente se ha producido un incremento en el área total usada para el cultivo de *T. cacao*, alcanzando la novena posición como productor mundial de cacao, predominando especies de la variedad Criollo con distintas características de sabor y aroma, especialmente adecuada para la elaboración exclusiva de derivados de chocolate (Motamayor et al., 2002). En 2018, en el departamento de Santander contó con un área cultivada de 47,229 hectáreas que producen 24,890 toneladas de cacao, particularmente en el municipio de San Vicente de Chucurí, conocido como la capital cacaotera de Colombia, tuvo un área cultivada de 17,000 hectáreas y un total de 6,540 toneladas (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2019).

En 2018, la Unión Europea anunció la incorporación de la resolución 1881/2006 dentro de la regulación 488/2014, en la cual se especifica los niveles de Cd máximos en derivados de chocolate, entrando en vigencia en enero de 2019 (EU, 2014).

La presencia de Cd en suelos cultivados con cacao causa problemas de abastecimiento y limita el área de cultivo disponible (suelos con baja concentración de Cd), lo cual afecta la producción y procesamiento de derivados de chocolate, así como las ventas locales y exportación para cumplir con regulaciones para la concentración de Cd en alimentos (Chavez et al., 2015). El origen del Cd, así como otros metales pesados presentes en suelos, pueden provenir de fuentes naturales y antropogénicas. Respecto a las fuentes naturales de Cd, los suelos de origen volcánico son los de mayor representación, más aún que los suelos de la cordillera oriental que cubren al departamento de Santander, provienen de materiales geológicos cretácico que contienen principalmente rocas ígneas y sedimentarias (Mantilla et al., 2013). Comparando diferentes tipos de suelos, los derivados de rocas ígneas usualmente contienen bajas cantidades de Cd, mientras que los suelos derivados de rocas sedimentarias, específicamente las lutitas, contienen altos niveles de Cd (He et al., 2015). Acerca de fuentes antropogénicas de contaminación con Cd en suelos de Santander, ha sido reportado que el Cd proviene de minería, contaminación del aire y fertilización química del suelo (Bravo et al., 2018). La movilidad de elementos traza, incluyendo Cd en suelo y su absorción por las plantas depende de factores como textura, pH, capacidad efectiva de intercambio catiónico, materia orgánica, concentración de Cd, especiación química, variedad de plantas y prácticas agrícolas (Yang et al., 2016).

El conocimiento de la diversidad del suelo, particularmente de la fracción bacteriana es limitada, únicamente una fracción menor de las especies microbianas han sido cultivadas y se estima que más de 10,000 genomas y 10^9 bacterias pueden estar presentes en un gramo de suelo (Fierer et al., 2017); además, la caracterización del potencial metabólico de las comunidades microbianas presentes en suelo y el efecto de las variables del suelo y contaminantes es un gran desafío (Gómez et al., 2011). Las bacterias son importantes componentes del ecosistema, juegan un papel fundamental en el ciclo bioquímico del suelo, son ampliamente diversas y abundantes dependiendo del hábitat (Fierer et al., 2012), participan en procesos de descomposición, fijación de minerales, mantenimiento de funciones o actividad biológica y condiciones fisicoquímicas del suelo (Bissett et al., 2013). Los microorganismos, en especial las bacterias, cuentan con varios mecanismos de

defensa para superar la toxicidad de Cd, las cuales podrían utilizarse para remediar este metal pesado presente en el suelo. La información existente respecto a bacterias aisladas del suelo cultivados con plantas en diferentes países asiáticos y europeos, reportando mecanismos de acción como su capacidad de biosorción y bioacumulación de Cd (Siripornadulsil and Siripornadulsil, 2013; Mitra et al., 2018; Sun et al., 2020; Shi et al., 2020). Algunos estudios relacionan los efectos de contaminación de Cd sobre las comunidades microbianas basados en análisis cultivo dependiente (Bravo et al., 2018) y por técnicas independientes de cultivo (Luo et al., 2019). Estas técnicas proveen una expansión en la comprensión del ecosistema microbiano del suelo. La selección de medios y condiciones de cultivo, mientras la contribución de información clave sobre la fisiología de bacterias aisladas y genes envueltos, también exhibe importantes limitaciones para lograr una imagen representativa de la composición microbiana.

En cuanto a las técnicas cultivo independiente, como electroforesis en gradiente en gel desnaturizante (DGGE), análisis de ácidos fosfolípidos (PLF) y amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) (Ezekoye et al., 2018), clonación de librerías y técnicas de secuenciación masiva como Illumina (Soliman et al., 2017), han sido exitosamente utilizadas para describir ecosistemas microbianos complejos, destacando la dominancia de Proteobacteria, Chloroflexi, Acidobacteria, Actinobacteria, Gemmatimonadetes, Verrocumicrobia, Thaumarchaeota, Firmicutes y Nitrospirae en suelos bajo estrés del metal (Ezekoye et al., 2018; Luo et al., 2019).

El objetivo de este capítulo es estudiar la diversidad de comunidades bacterianas asociadas a suelos cultivados con cacao y geológicamente demostrada con diferentes concentraciones de Cd en fincas localizadas en Santander, Colombia. Se examinó la composición taxonómica de comunidades bacterianas y su interacción con las propiedades fisicoquímicas del suelo y se obtuvo el aislamiento e identificación de bacterias nativas tolerantes a Cd; lo anterior se logró empleando métodos cultivo dependiente y secuenciación gen ARN ribosomal 16S. Este estudio ofrece nuevas pistas respecto a la evaluación de comunidades bacterianas en suelos cultivados con cacao en presencia de Cd en Colombia y su papel ecológico dentro de las comunidades.

2. MATERIALES y MÉTODOS

2.1. Declaración ética

La recolección de las muestras de suelo se realizó en fincas cacaoteras de propiedad privada, sin requerir permisos específicos, contando con la autorización verbal de los propietarios antes de efectuar el muestreo, previa explicación del propósito investigativo para su recolección. Proyecto enmarcado dentro del permiso Marco de Recolección de Especímenes de la Universidad Nacional de Colombia. Proyecto Código: 44813 del grupo de MICROBIOP.

2.2. Premuestreo fincas cacaoteras

Por la falta de información y de acuerdo con la recomendación de expertos del sector, se sugirió la realización de un premuestreo en base al historial de productores de cacao que venden el grano a la Compañía Nacional de Chocolates en el departamento de Santander. Para ello, se seleccionó 8 fincas cacaoteras ubicadas en el municipio de San Vicente de Chucuri (capital cacaotera de Colombia); a las cuales se realizó muestreo, tanto de suelos como de material vegetal (datos no mostrados). Para las etapas sucesivas de la investigación y en base a los resultados, se seleccionó 4 fincas cacaoteras que cumplen los criterios de pH ácido y neutro a diferentes concentraciones de Cd geogénico en suelo.

2.3. Descripción de muestreo y colección de muestras

Una vez seleccionadas las fincas cacaoteras indicadas en la tabla 1, las cuales están localizadas en tierra de ladera entre 600 a 900 metros sobre el nivel del mar, con una temperatura promedio de 26 °C, precipitación anual entre 1400 a 2600 mm, cuentan con suelos tipo Inceptisol, los cuales son formados por actividad volcánica y naturaleza sedimentaria, moderadamente profundo y con topografía llana a quebrada.

Tabla 1. Descripción de los sitios de estudio.

Finca+	Coordenadas GPS	Variedad cacao
LA	6°55'N and 73°28'W	ISC-95, CCN-51
SV	6°53'N and 73°23'W	ICS-39, ICS-60, CCN-51
LM	6°54'N and 73°22'W	ICS-95, CCN-51
Y	6°54'N and 73°44'W	ICS-39, ICS-95, CCN-51

+ La Argentina (LA); Siempre Viva (SV); Los Medios (LM); Yariguies (Y).

Las muestras de suelo no rizosférico (horizonte 0 - A (0–30 cm), se colectaron en las fincas cacaoteras: Siempre Viva (SV), La Argentina (LA), Los Medios (LM) y Yariguies (Y), de acuerdo con la guía de muestreo de suelos de la Universidad Nacional de Colombia (Osorio y Ruiz, 2013). Dentro de cada lote definido (cultivado únicamente con cacao) para cada finca, las muestras compuestas se colectaron durante los meses de mayo y junio de 2017: 12 muestras (tres muestras independientes por finca). Cada muestra compuesta fue obtenida a partir de 18 sub-muestras, colectadas después de una ruta en zigzag del área de interés con el fin de lograr uniformidad, representatividad y aleatoriedad del área del cultivo a muestrear; además, los puntos seleccionados fueron escogidos de tal manera que coincidieran con árboles de cacao en presencia de mazorcas, abundante biomasa aérea, georeferenciados por GPS a una distancia del tronco principal entre 50 a 70 cm (Gramlich et al., 2018).

El muestreo fue realizado limpiando la superficie y se introdujo un barreno hasta la profundidad deseada (30 cm). Para la recolección y manipulación final de las muestras, se siguió la metodología indicada en la NTC 4113-6. Después de la homogenización de las submuestras, cuarteos sucesivos y cribado a través de un tamiz malla 10 (2 mm), la unidad total de muestreo contó con un peso promedio de 3 kilos; las muestras se depositaron en bolsas plásticas estériles y transportadas al laboratorio en hielo seco, donde se fraccionó en tres partes para análisis de propiedades de suelo, análisis cultivo dependiente y extracción de ADN total, cada muestra fue almacenada a -20°C hasta su procesamiento. En material suplementario, se adjunta el protocolo de muestreo realizado.

2.4. Caracterización de los suelos en las fincas muestreadas

Las propiedades del suelo (análisis de fertilidad elementos intercambiables) se midieron siguiendo los protocolos descritos en las normas nacionales estándar ICONTEC: pH, conductividad eléctrica (CE) y capacidad catiónica de intercambio efectivo (C.I.C.E) por la NTC 5167; textura (método bouyoucos); Materia orgánica (OM) y carbono (C) (NTC 5403); fósforo (P) (NTC 5530); potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y sodio (Na) de acuerdo con la NTC 5349; cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), aluminio (Al) y zinc (Zn) por la NTC 5526; azufre (S) y boro (B) siguiendo la NTC 5404 y cadmio total (TCd) (NTC 3934). En la tabla S1 señala la información detallada sobre el análisis de las propiedades de suelo y en las figuras S9–10 se adjuntan algunos de los reportes de resultados por parte del laboratorio externo acreditado en cada técnica empleada (Hseu et al., 2002).

2.5. Ensayos cultivo dependiente

2.5.1. Aislamiento de bacterias y unidades formadoras de colonia

Para cada una de las fincas, se pesó 1 g (peso neto) de las muestras compuestas y se sumergió en agua peptonada y cultivado usando diluciones seriadas y sembradas por superficie (esparcido por espátula drigalski) sobre agar nutritivo (AN) y R2A (Merck®) (composición en tabla S1); los cuales son medios de cultivo no selectivos, lo cual promueve el crecimiento de una mayor diversidad de bacterias cultivables, bajo dos tratamientos con y sin adición de cloruro de cadmio (Meyer®) a una concentración de 2500 μM CdCl_2 (Siripornadulsil and Siripornadulsil, 2013). Este cloruro de cadmio fue adicionado al medio antes de autoclavar, y el pH del medio fue ajustado hasta pH 7.0 con NaOH 0.1N. Las placas fueron incubadas aeróbicamente a 30°C por 48 horas para AN y 7 días para R2A; Los procedimientos microbiológicos se realizaron bajo condiciones estériles, siguiendo las buenas prácticas del laboratorio con rigurosidad de asepsia, incluyendo controles negativos (agua peptonada esteril y su siembra en placas de cada medio de cultivo). Las colonias puras con diferentes caracteres morfológicos (tamaño colonia, elevación y pigmentación) fueron aislados de las placas de medios y sub-cultivadas hasta obtener cultivos de bacterias puras. Los aislados seleccionados fueron caracterizados microscópicamente por tinción de Gram y crio-preservados en 20% de glicerol a -20°C.

2.5.2. Análisis del espaciador ribosomal intergénico (RISA) y PCR ADN ribosomal 16S de bacterias tolerantes a Cd

Las colonias puras fueron sembradas en agar nutritivo al menos tres (3) veces y los aislados puros fueron caracterizados en orden de clasificación y agrupados por su huella (RISA), mediante la amplificación del espaciador intergénico entre los genes 16S y 23S a partir de los aislados bacterianos obtenidos por lisis de colonia, realizando una PCR usando los iniciadores L1 (5'-CAA GGC ATC CAC CGT-3') y G1 (5'-GAA GTC GTA ACA AGG-3') (Jensen et al., 1993) de acuerdo con el protocolo descrito por Moreno et al., 2002.

Los patrones RISA se resolvieron por electroforesis de poliacrilamida (PAGE), usando el software Gel Compare (Applied Biosystems, Belgium) (García et al., 2016); se realizó la electroforesis RISA-PAGE en una unidad o celda tetra Mini-PROTEAN con geles de 7% poliacrilamida (relación de acrilamida/bis-acrilamida 29:1) por 100 min a 130 v. El análisis de agrupamiento fue realizado usando el coeficiente Pearson y el método Simple Linkage clustering. Para ordenar correctamente los representantes de la diversidad bacteriana asociada con suelos, una similitud > 90% entre patrones RISA fue establecida como criterio de selección para los aislados bacterianos y su subsecuente ensayo de identificación molecular (Yim & Ramdeen, 2015).

Una vez seleccionadas las colonias de interés, se realizó a cada una de estas, la extracción de ADN total y se amplificó el gen ARN ribosomal 16S (1.5 kbp), usando los iniciadores Eubac 27 F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') y 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACTT-3') como se describió anteriormente por Moreno et al., 2002. Los controles tanto positivos como negativos (*Bacillus cereus* (ATCC®14579™) y agua ultrapura estéril respectivamente) fueron rutinariamente incluidos en todas las reacciones PCR. Los productos amplificados fueron verificados por su visualización en gel de agarosa al 1%, teñido con GelRed® (Biotium, Inc., USA) en un transiluminador (BioRad Laboratories, Inc. CA, USA).

2.5.3. Secuenciación y análisis filogenético

Los productos de PCR del gen ARNr 16S fueron purificados usando el kit ilustra® GFX PCR DNA y el kit de purificación de banda en gel (GE Healthcare, UK Limited Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido); ambas cadenas (Forward y Reverse) se secuenciaron directamente en el equipo ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems, Carlsbad). Luego, las

secuencias obtenidas fueron editadas y curadas, logrando las secuencias consenso usando el software BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>), se alinearon junto con las obtenidas en este estudio utilizando Clustal W (Thompson et al., 1994) que se encuentra como complemento en MEGA X y se compararon con la base de datos del Genbank utilizando el algoritmo BLAST (BLASTn). Las secuencias del gen ARNr 16S también se compararon con el Proyecto de Bases de Datos Ribosomal (RDP) (Altschul et al., 1997; Cole et al., 2009). Las secuencias homólogas se obtuvieron de la base de datos Genbank y se alinearon junto con las obtenidas en este estudio utilizando Clustal W (Thompson et al., 1994) que se encuentra como complemento en MEGA X. las secuencias obtenidas se enviaron a la base de datos Genbank cuyos números de acceso se resumen en la tabla 4. La relación filogenética se analizó utilizando un dendograma realizado en el programa MEGA X bajo el método Maximum Likelihood y modelo Kimura 2-parameter (Kimura, M., 1980) con un estimador bootstrap de 1000 repeticiones, usando como grupo externo la secuencia del gen ARNr 16S de la archaea *Nanoarchaeum equitans* (NR103024).

2.6. Análisis independiente de cultivo

2.6.1. Extracción ADN total de suelo y secuenciación de alto rendimiento

Se usó el kit PowerSoil® DNA Isolation (MO BIO Laboratories, Inc.) para extraer el ADN total de las muestras de suelo, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. La calidad del ADN purificado fue evaluada por espectrofotometría en un Nanodrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) en base a la relación de absorbancias 260/280 nm y 260/230 nm y almacenado a -20°C para análisis posteriores. La amplificación por PCR del gen ARNr 16S fueron usados para determinar la diversidad bacteriana y composición de la comunidad. La región hipervariable V4 de los genes ARNr 16S presentes en el ADN total de suelo, fue amplificado usando los siguientes cebadores: 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') (Parada, Needham, & Fuhrman, 2016) – 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3') (Apprill, McNally, Parsons, & Weber, 2015). Las librerías fueron construidas usando la tecnología de emparejamiento principio-fin y la secuenciación multiplexada fue realizada usando la plataforma Illumina Miseq. 2 x 250 pb empleando los adaptadores indicados en la tabla 2. Una vez obtenidas, las secuencias crudas fueron procesadas siguiendo el programa QIIME 2.0 (Caporaso et al., 2010).

Después del proceso de-multiplexado, las secuencias fueron validadas por calidad de acuerdo con el programa DADA2 en RStudio donde las secuencias crudas de baja calidad (puntaje de calidad promedio < 30) fueron descartadas sin someterse a análisis posterior; las quimeras fueron extraídas de los datos usando el mismo programa, además de remover los singletons y eliminación de cebadores (Callahan et al., 2016); de esta manera se obtuvo los ASV (Amplicon sequence variant) para todas las muestras, los cuales con una identidad de secuencias del 100%, se clasificaron según la base de datos SILVA 138 (https://zenodo.org/record/4587955/files/silva_nr99_v138.1_wSpecies_train_set.fa.gz?download=1, acceso en mayo de 2021) (Wang et al., 2007).

Tabla 2. Adaptadores usados para cada muestra (Fuente: Microbiomas Foundation).

# Sample ID	Adaptadores (Barcode Sequence)	Linker Primer Sequence
Y3	TGGGTACA	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA
Y2	TGGGCTTG	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA
Y1	TGGGCGCC	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA
LA3	TGGGCCTT	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA
LA2	TGGGCATC	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA
LA1	TGGGATTA	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA
SV3	TGGGAGAA	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA
SV2	TGGGAATA	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA
SV1	TGGCTTAT	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA
LM3	TGGGAGTT	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA
LM2	TGGGAGCC	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA
LM1	TGGGAGCA	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA

2.7. Análisis estadístico

Para los ensayos cultivo dependiente, se realizó las comparaciones entre el número de unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g) entre medios y fincas, mediante análisis de varianza (ANOVA) de Log (UFC/g) y prueba de Tukey para los recuentos entre medios y fincas usando RStudio.

Respecto al análisis de los datos obtenidos por técnicas de cultivo independiente, se empleó la plataforma Microbiome analyst (<https://www.microbiomeanalyst.ca/>) para validar

integridad de los datos, filtrar secuencias de baja abundancia, normalización (rarefacción), y realizar comparaciones en términos de abundancia relativa, alfa-diversidad y beta-diversidad (McMurdie & Holmes, 2013). Se calcularon los índices de alfa diversidad Observada, Chao1 (diversidad estimada), Shannon (igualdad) y Simpson (diversidad bacteriana), evaluando significancia mediante ANOVA y correlación de Pearson frente a propiedades de suelo. En cuanto a la beta-diversidad y en base a la distancia Bray–Curtis y análisis PERMANOVA, se visualizó la diferencia estructural de comunidades utilizando el análisis de Coordenadas Principales (PCoA) y para la prueba de hipótesis se usó el análisis de varianza multivariado permutacional (PERMANOVA) considerando como diferencias significativas entre los factores si la probabilidad estadística observada es < 5% ($p < 0.05$). Se realizó un análisis de redundancia para relacionar la variación de la abundancia relativa de las comunidades bacterianas identificadas por análisis dependiente e independiente de cultivo frente a las propiedades de suelo en RStudio (Liu et al., 2020). Luego se calculó la relación entre abundancia relativa de ASV's y las variables de suelo usando prueba de correlación Spearman's y un heatmap fue realizado para visualizar la correlación (Pradhan et al., 2020).

2.8. Secuencias depositadas en Genbank

Treinta y cinco secuencias crudas obtenidas luego de la secuenciación del gen ARNr 16S de las bacterias aisladas, recibieron los números de acceso Genbank indicados en la tabla 3; los datos crudos de las secuencias 16S amplificadas están depositadas y disponibles en NCBI bajo el BioProject ID SUB6627411 con Sequence Reads Archive (SRA) número de acceso PRJNA599345.

3. Resultados

3.1. Premuestreo realizado

De acuerdo con la correlación de Pearson bajo un nivel de significancia del 95%, mostró que no hay diferencias significativas de [Cd] total en suelo frente al % arcilla (valor_p = 0.5379), % arena (valor_p = 0.2448), % limo (valor_p = 0.1185) y [Cd] en hojas (valor_p = 0.0890); mientras que si se presentó diferencias significativas con Zn (valor_p = 0.0073), Conductividad Eléctrica (valor_p = 0.002), Fe (valor_p = 0.00033), Capacidad Intercambio Catiónico Efectivo (valor_p = 0.0094), pH (valor_p = 0.0007), materia orgánica (C) (valor_p = 0.0037) y [Cd] presente en grano (valor_p = 0.00012), hallazgos similares a los reportados por Pabon et al., (2014) y Vanderschueren et al., (2021).

3.2. Propiedades fisicoquímicas de las muestras de suelo de fincas elegidas

Las principales características de los suelos cacaoteros se resumen en la tabla S2. En líneas generales, todos los suelos de las fincas son de tipo inceptisol con textura franco arcillosa, los cuales cuentan con gran capacidad para retener agua y nutrientes con tamaño de partícula fino. De acuerdo con la guía ambiental para el cultivo del cacao publicada por Fedecacao en el año 2013, suelos con pH entre 4.5 y 7.0 son aptos para la siembra de cacao, intervalo en el cual se encuentran las fincas seleccionadas. En cuanto a contenido de materia orgánica (MO), el intervalo apto para el cultivo debe estar entre 3 al 5%, valores que cumplen la mayoría de las fincas con excepción de la finca Yariguies. Para P y K, las concentraciones aptas están entre 8-14 mg/Kg y 0.2-0.38 mg/Kg respectivamente, y los valores indican deficiencia de P y K para las fincas LA y Y. De la misma forma, para Ca y Mg, los niveles óptimos se encuentran entre 5.1-8.9 meq/100g y 1.7-2.3 meq/100g respectivamente. Con excepción de la finca Yariguies (Y), las demás cuentan con niveles elevados de Ca y todas las fincas presentan deficiencia de Mg. En cuanto a la concentración de Cd, de acuerdo con el máximo nivel permitido por la Unión Europea de 1.1 mg/Kg para suelos cultivables (Ding et al., 2018), las fincas LA, SV se consideran con alta concentración de Cd y Lm, Y con baja concentración de Cd. De acuerdo con la correlación Pearson entre las diferentes propiedades de suelo (tabla S3), se encontró correlación negativa del pH frente a arena y arcilla ($p < 0.05$) y correlación positiva con C.I.C.E., C, MO, Ca, Zn ($p < 0.01$), Mn, Al y Cd ($p < 0.05$); Respecto a MO correlación positiva frente a pH, C.I.C.E., C, Mn, Zn ($p < 0.01$) y Ca, Fe y Cd ($p < 0.05$); en cuanto a Cd, se encontró correlación positiva frente a pH, MO, C ($P < 0.05$) y C.I.C.E., Zn y Al ($p < 0.01$); la

concentración de Zn presento correlación positiva frente a pH, C.I.C.E, C, MO, Al y Cd ($p < 0.01$).

3.3. Diversidad bacteriana a través de ensayos cultivo-dependiente

3.3.1. Análisis microbiológicos

Los recuentos bacterianos fluctuaron entre $2.7\text{--}2.9 \times 10^5$ UFC/g hasta $4.1\text{--}4.3 \times 10^5$ UFC/g para los suelos de todas las fincas, se realizó la prueba de Tukey e independiente de los medios de cultivo y niveles de Cd presente en las muestras de suelo, no se encontró diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) (Fig.1). La abundancia de las bacterias cultivables varió de manera importante de acuerdo con los sitios de muestreo, manteniendo cierta relatividad en el tiempo. Se logró obtener 128 aislados tolerantes a Cd en los medios de cultivo comercial con presencia de $2,500 \mu\text{M CdCl}_2$ (120 mg/Kg), de los cuales 76 en agar nutritivo y 52 aislados en agar R2A; los cuales fueron purificados y caracterizados morfológicamente: 107 aislados fueron bacilos (83%), 21 cocos (17%); 105 Gram negativos (82%) y 23 Gram positivos (18%).

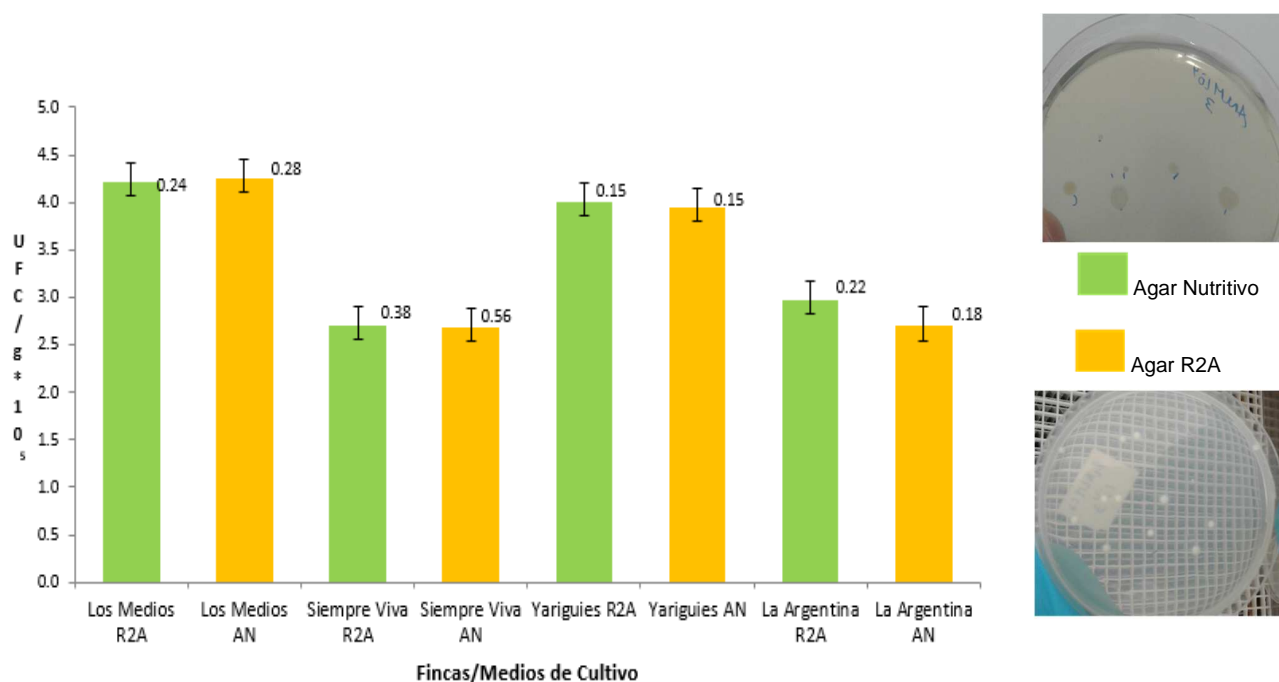


Figura 1. Recuento de bacterias totales (UFC/g) para las muestras de suelo.

3.3.2. Análisis del espaciador intergénico Ribosomal (RISA)

De acuerdo con el dendograma generado por el software Gelcompar II® (Fig. S1), se generaron 95 grupos, y de acuerdo con los patrones de bandas con un porcentaje de similitud del 90%, se identificó a 16 agrupamientos, de los cuales se seleccionó a 35 aislados tolerantes a Cd presumiblemente diferentes para su identificación molecular por la amplificación y secuenciación Sanger del gen ARN ribosomal 16S.

3.3.3. Identificación de aislados con secuenciación del gen ARN ribosomal 16S

Tanto las afiliaciones filogenéticas, como las similitudes de los aislados seleccionados para la secuenciación, se resumen en la tabla 3. Los aislados pertenecen a los filos Proteobacteria, Actinobacteriota y Firmicutes. La evaluación de las secuencias reveló la presencia de *Burkholderia* sp., *Exiguobacterium* sp. y *Ralstonia* sp., fueron encontrados en todas las muestras sin importar los niveles de Cd en suelo, mientras que *Bacillus* sp., *Cupriavidus* sp. y *Serratia* sp. se encontraron únicamente en suelos con alta concentración de Cd y *Dermacoccus* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia* sp., *Klebsiella* sp., *Lactococcus* sp. y *Staphylococcus* sp. en suelos con baja concentración de Cd. La relación filogenética entre los aislados es mostrada en el dendograma generado por el método Maximum Likelihood (Fig. 2). En la figura 3, se observan las características morfológicas de las colonias de los géneros aislados y en específico para cada uno de los aislados se resumen en la figura S4 y en la tabla 4 se resumen la riqueza de géneros para cada una de las fincas.

Tabla 3. Identificación taxonómica de las bacterias tolerantes a Cd aisladas en las fincas cacaoteras, identificadas por secuenciación del gen ARN ribosomal 16S.

[Cd] en suelo	Código aislado	Medio cultivo	Pares bases	Identificación NCBI-GenBank [# Bases comparadas] (% similitud)	Afiliación filogenética	Número acceso NCBI
Alto	10-2	R2A	1544	NR_121761.1 [1160/1178] (98%)	<i>Bacillus toyonensis</i>	MN587894
	7-1	AN	1485	NR_104975.1 [1228/1236] (99%)	<i>Burkholderia anthina</i>	MT940970
	9-1	AN	1485	NR_104975.1 [1261/1268] (99%)		MT940971
	18-1	AN	1485	NR_104975.1 [1161/1171] (99%)		MT940974
	3-2	R2A	1485	NR_104975.1 [1145/1173] (98%)		MT940975
	5-2	AN	1485	NR_104975.1 [1228/1237] (99%)		MT940976
	23-2	R2A	1485	NR_104975.1 [1129/1137] (99%)		MT940979
	8-5	AN	1485	NR_104975.1 [1162/1168] (99%)		MT940982
	10-1	AN	1526	NR_074687.1 [1151/1158] (99%)	<i>Burkholderia ambifaria</i>	MT900972
	17-2	R2A	1502	NR_042634.1 [1151/1164] (99%)	<i>Burkholderia arboris</i>	MT940978
	17-1	R2A	1502	NR_042634.1 [1235/1237] (99%)		MN587896
	15-1	R2A	1520	NR_102851.1 [1180/1208] (98%)	<i>Cupriavidus necator</i>	MN587892
	1-2	AN	1520	NR_102851.1 [1180/1221] (97%)		MT940980
	4-2	AN	1542	NR_074902.1 [1235/1246] (99%)	<i>Escherichia fergusonii</i>	MN587901
	7-2	AN	1542	NR_074902.1 [1264/1276] (99%)		MT940977
	11-4A	AN	1550	NR_043479.1 [1260/1269] (99%)	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	MN587893
	16-1	R2A	1434	NR_118984.1 [1249/1261] (99%)	<i>Ralstonia solanacearum</i>	MN587895
	6-2	R2A	1464	NR_113236.1 [1262/1272] (99%)	<i>Serratia marcescens</i>	MN587899
	20-2	R2A	1464	NR_113236.1 [1301/1307] (99%)		MT940981
Bajo	20-3	AN	1485	NR_104975.1 [1233/1248] (99%)	<i>Burkholderia anthina</i>	MT940990
	21-3	AN	1527	NR_102890.1 [1242/1253] (99%)	<i>Burkholderia lata</i>	MT940984
	7-4	AN	1527	NR_102890.1 [1220/1235] (99%)		MT940986
	14-5	AN	1527	NR_102890.1 [1318/1324] (99%)		MT940988
	19-3	AN	1313	NR_116153.1 [1265/1268] (99%)	<i>Burkholderia ubonensis</i>	MT940989
	4-3	R2A	1468	NR_043261.1 [1142/1180] (97%)	<i>Dermacoccus barathri</i>	MN587890
	2-4	AN	1465	NR_113614.1 [1219/1227] (99%)	<i>Enterobacter aerogenes</i>	MT940985
	29-4B	R2A	1522	NR_146667.2 [1268/1282] (99%)	<i>Enterobacter tabaci</i>	MN587891
	9-4	AN	1550	NR_043479.1 [1268/1275] (99%)		MT940991
	16-4	AN	1412	NR_025635.1 [1263/1265] (99%)	<i>Klebsiella variicola</i>	MT940987
	18-4B	AN	1412	NR_025635.1 [1203/1208] (99%)		MN587897
	22-4	R2A	1499	NR_040955.1 [1231/1233] (99%)	<i>Lactococcus lactis</i>	MN587898
	21-4	R2A	1499	NR_040955.1 [1187/1194] (99%)		MT940992
	16-3	AN	1434	NR_118984.1 [1197/1221] (98%)	<i>Ralstonia solanacearum</i>	MT940983
	2-3	R2A	1473	NR_113348.1 [1257/1260] (99%)	<i>Staphylococcus capitis</i>	MN587900

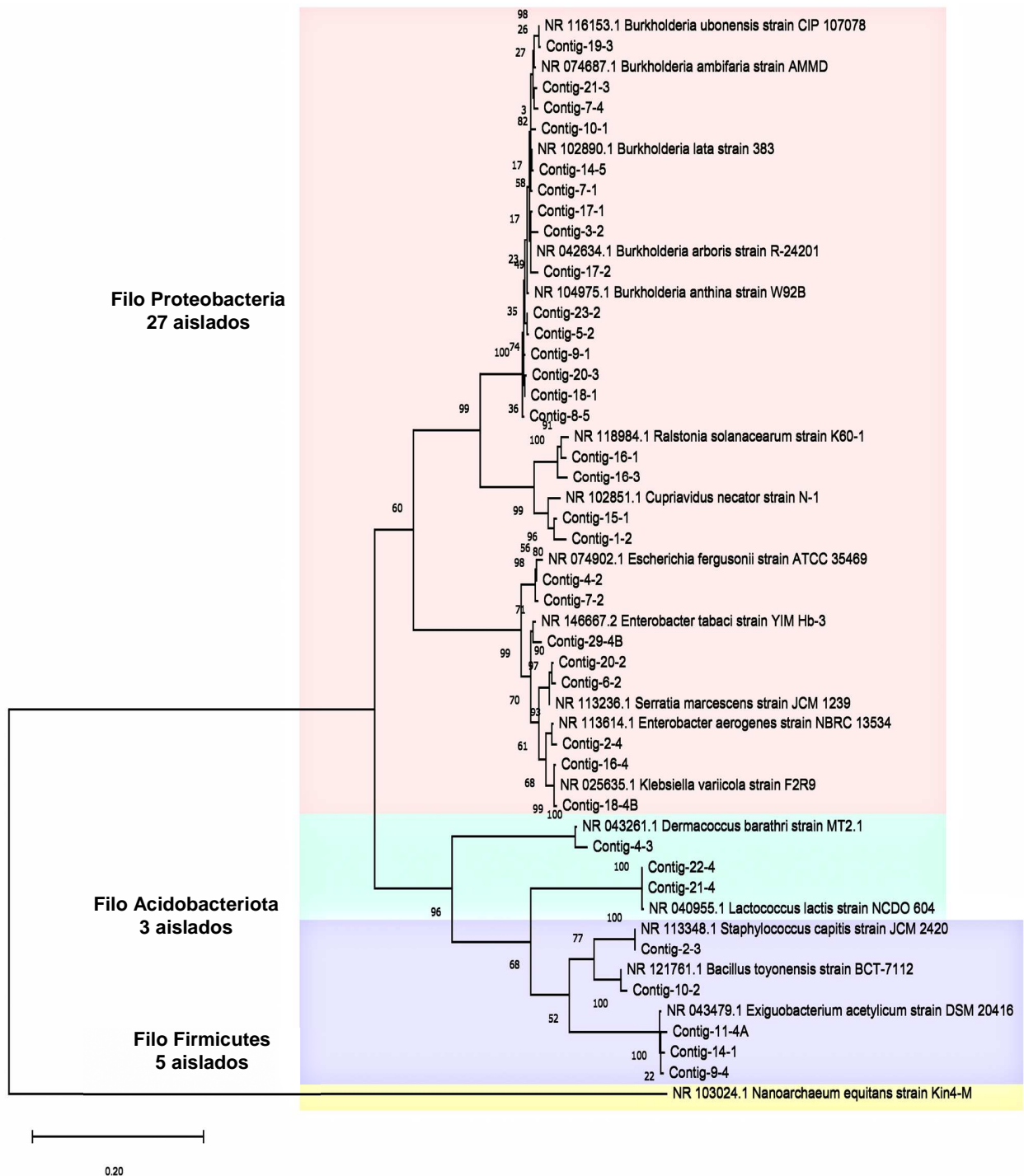


Figura 2. Dendrograma de las secuencias de genes ARNr 16S de cepas tolerantes a Cd con secuencias de referencia. Filogenia realizada bajo el método Maximum Likelihood con estimador bootstrap de 1000

repeticiones y las distancias bajo el modelo Kimura 2-parameter; como "outgroup" se empleó a *Nanoarchaeum equitans* (Archaea).

Tabla 4. Resumen de las 35 cepas tolerantes a Cd aisladas e identificadas basado en la secuenciación parcial del gen ARNr 16S.

Cepa	Género	Siempre Viva	La Argentina	Los Medios	Yariguies	Taxonomía-Clase
4-3	<i>Dermacoccus</i>			1		Actinobacteriota
10-2	<i>Bacillus</i>		1			Bacilli
21-4, 22-4	<i>Lactococcus</i>			1	1	Bacilli
2-3	<i>Staphylococcus</i>			1		Bacilli
14-1, 9-4, 11-4A	<i>Exiguobacterium</i>		1	1	1	Bacilli
7-1, 9-1, 10-1, 17-1, 18-1, 3-2, 5-2, 17-2, 23-2, 21-3, 19-3, 20-3, 7-4, 8-5, 14-5	<i>Burkholderia</i>	1	9	3	2	Betaproteobacteria
16-1, 16-3	<i>Ralstonia</i>		1	1		Betaproteobacteria
15-1, 1-2	<i>Cupriavidus</i>	1	1			Betaproteobacteria
4-2, 7-2	<i>Escherichia</i>		2			Gammaproteobacteria
2-4, 29-4B	<i>Enterobacter</i>			2		Gammaproteobacteria
6-2, 20-2	<i>Serratia</i>	1	1			Gammaproteobacteria
16-4, 18-4B	<i>Klebsiella</i>			1	1	Gammaproteobacteria
Riqueza géneros		3	7	8	4	

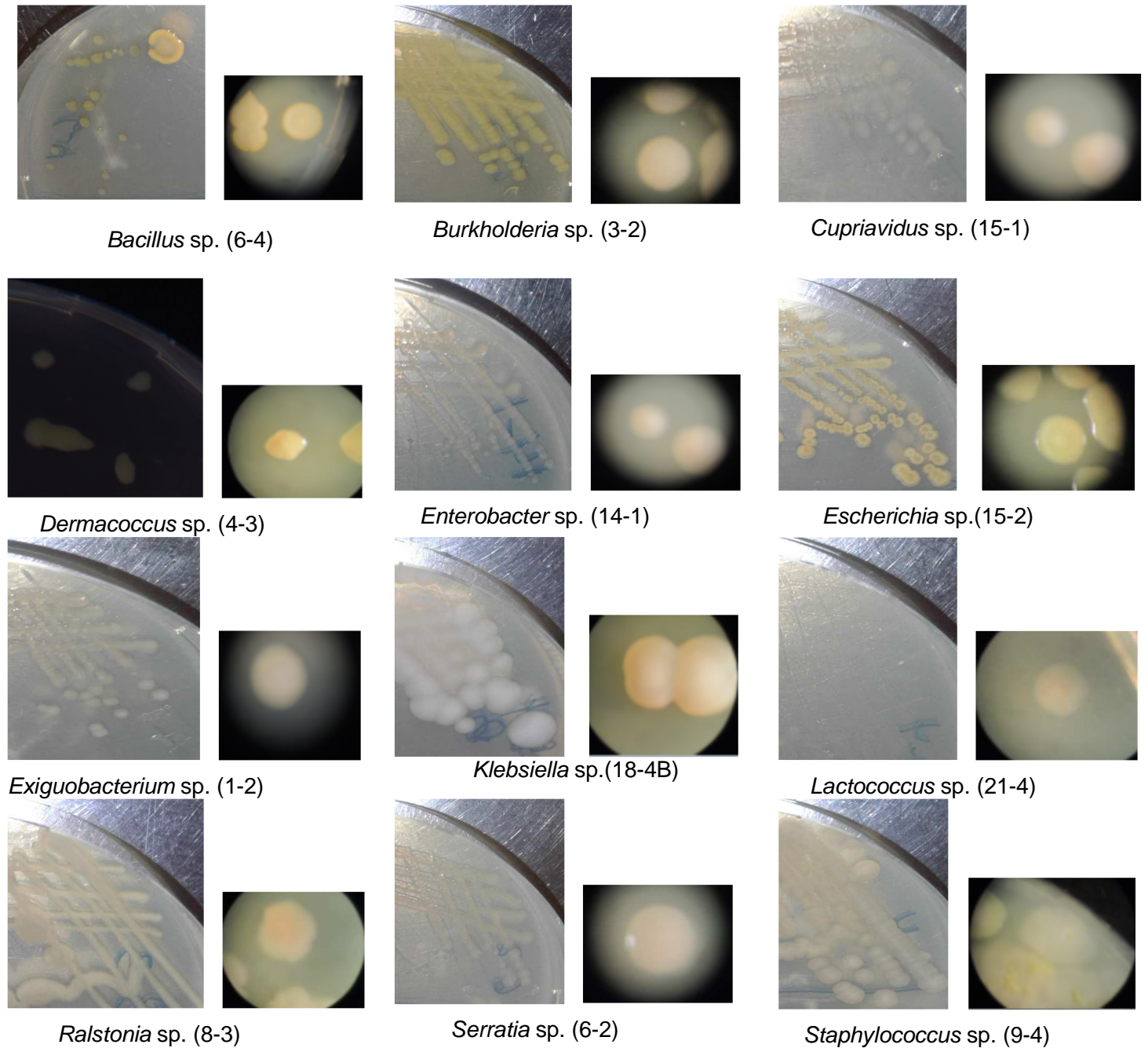


Figura 3. Morfología de las colonias nativas tolerantes a Cd aisladas en suelos cultivados con cacao, rayado en placa y vista de la colonia(s) en estereoscopio 20X; código del aislado en paréntesis (Fuente: autor).

3.4. Diversidad bacteriana a través de ensayos independiente de cultivo

3.4.1. Visión general de la secuenciación

Para las doce muestras se obtuvo un total de 443,464 lecturas para la región V4 del gen ARNr 16S que corresponden a 5,592 ASV's. Para análisis posteriores, se realizó en la Plataforma Microbiome Analyst, un filtro de ASV's de baja abundancia o prevalencia por default (minimum count 4; prevalence in sample: 20%), eliminando 1,461.

3.4.2. Normalización

En la misma plataforma y con el fin de eliminar la posible influencia de diferencia en el número de reads obtenidos, se realizó la normalización o rarefacción de las muestras hasta alcanzar 23,879 lecturas por muestra (fig. 4).

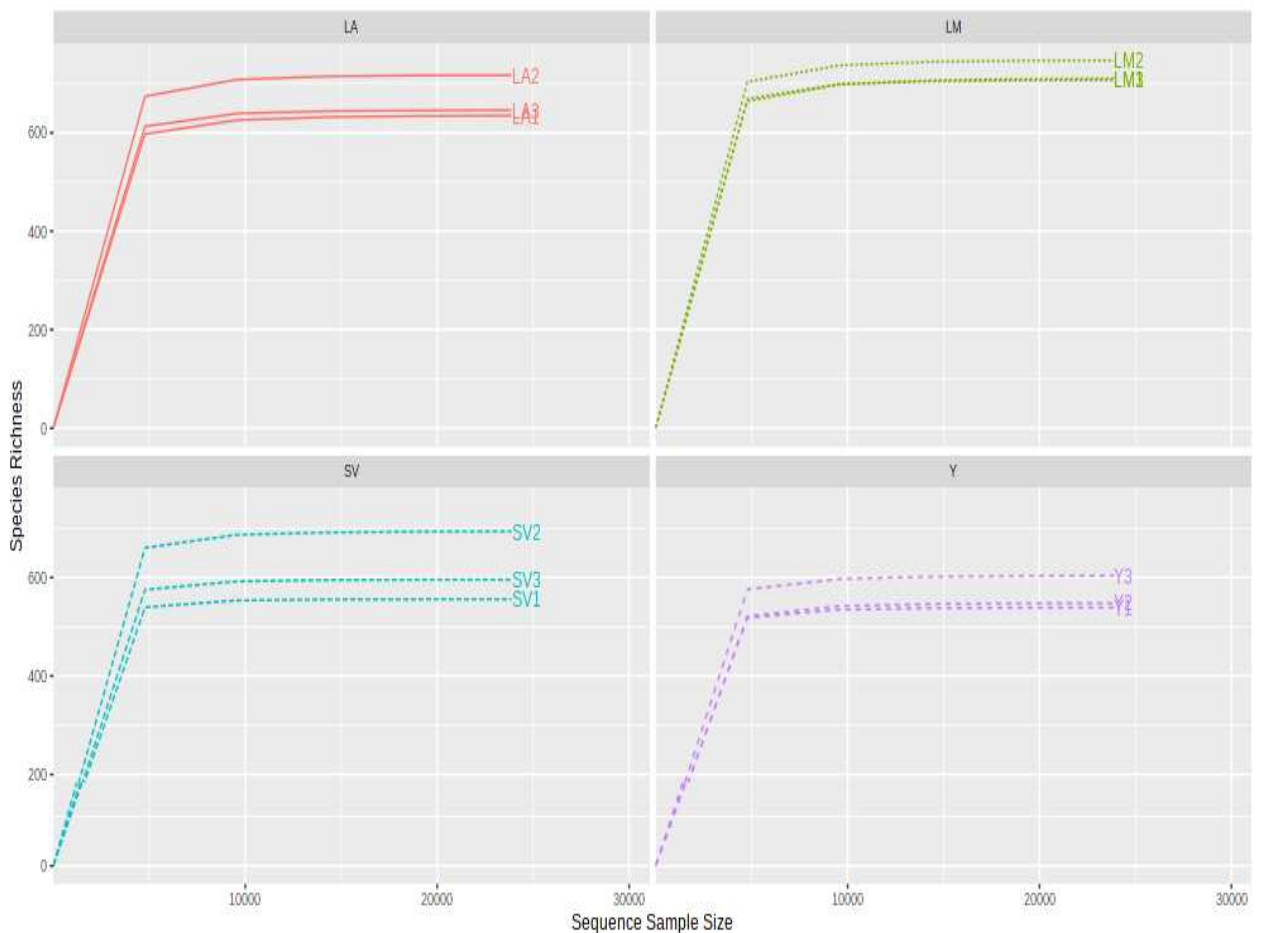


Figura 4. Curvas de normalización para cada una de las muestras analizadas. La Argentina (LA); Siempre Viva (SV); Los Medios (LM); Yariguies (Y).

3.4.3. Abundancia relativa de ASV's a nivel de filo y género

Para los suelos de las fincas cacaoteras, se identificó un total de 28 filos bacterianos, de los cuales los de mayor abundancia relativa son: Proteobacteria (22.87%), Acidobacteriota (18.08%), Actinobacteriota (9.79%), Verrucomicrobiota (9.73%), Myxococcota (6.71%), Chloroflexi (5.12%), Planctomycetota (5.03%), Bacteroidota (3.95%), Gemmatimonadota (3.65%), Nitrospirota (2.93%), Firmicutes (2.23%), NB1_J (2.07%) (Fig.5).

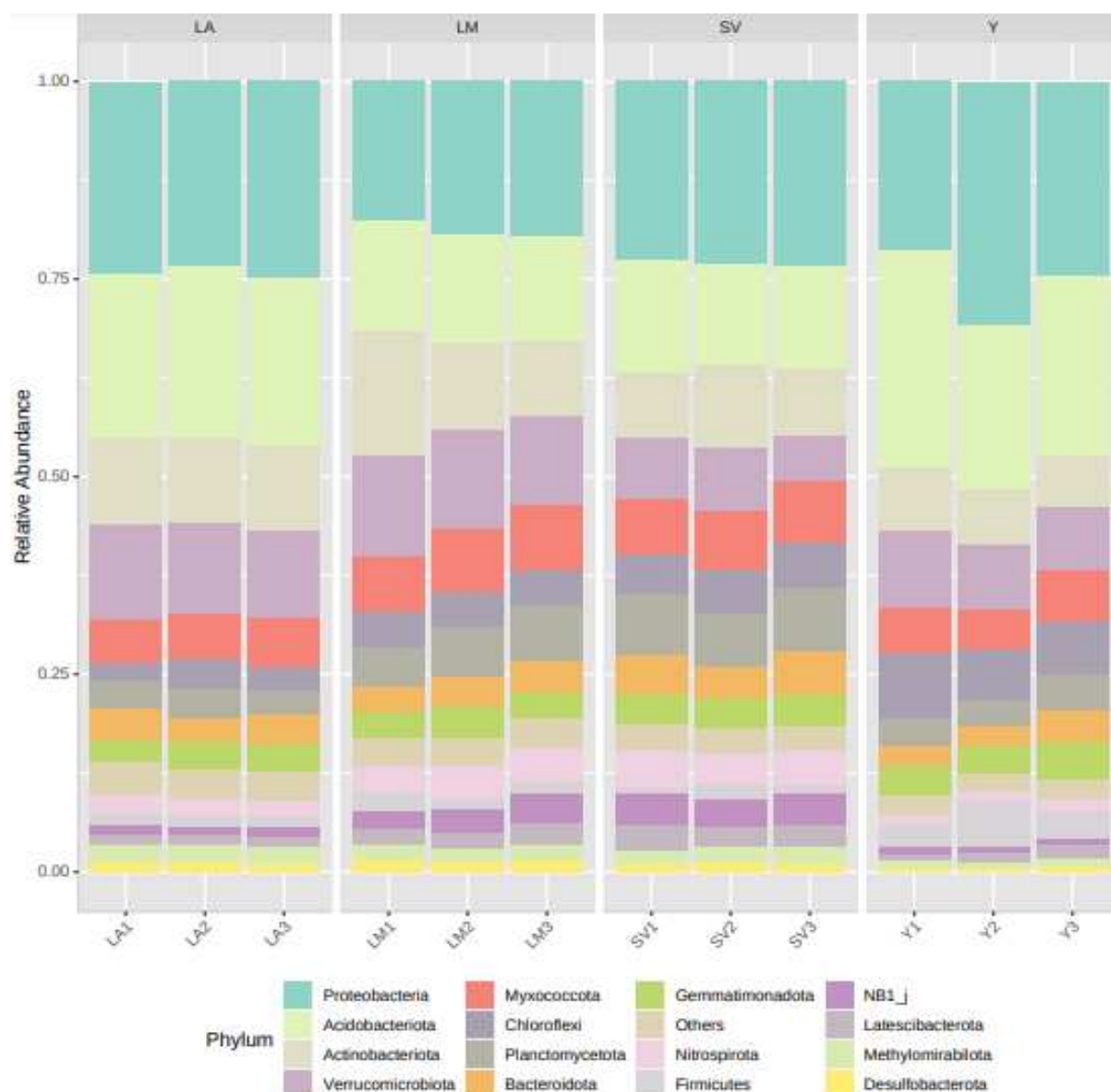


Figura 5. Histograma de la estructura taxonómica a nivel de filo de las comunidades bacterianas del suelo Argentina (LA); Siempre Viva (SV); Los Medios (LM); Yariguies (Y).

Para las muestras de suelos cacaoteros, se identificaron 148 géneros y en la figura 6 se muestran los 18 géneros con mayor abundancia relativa.

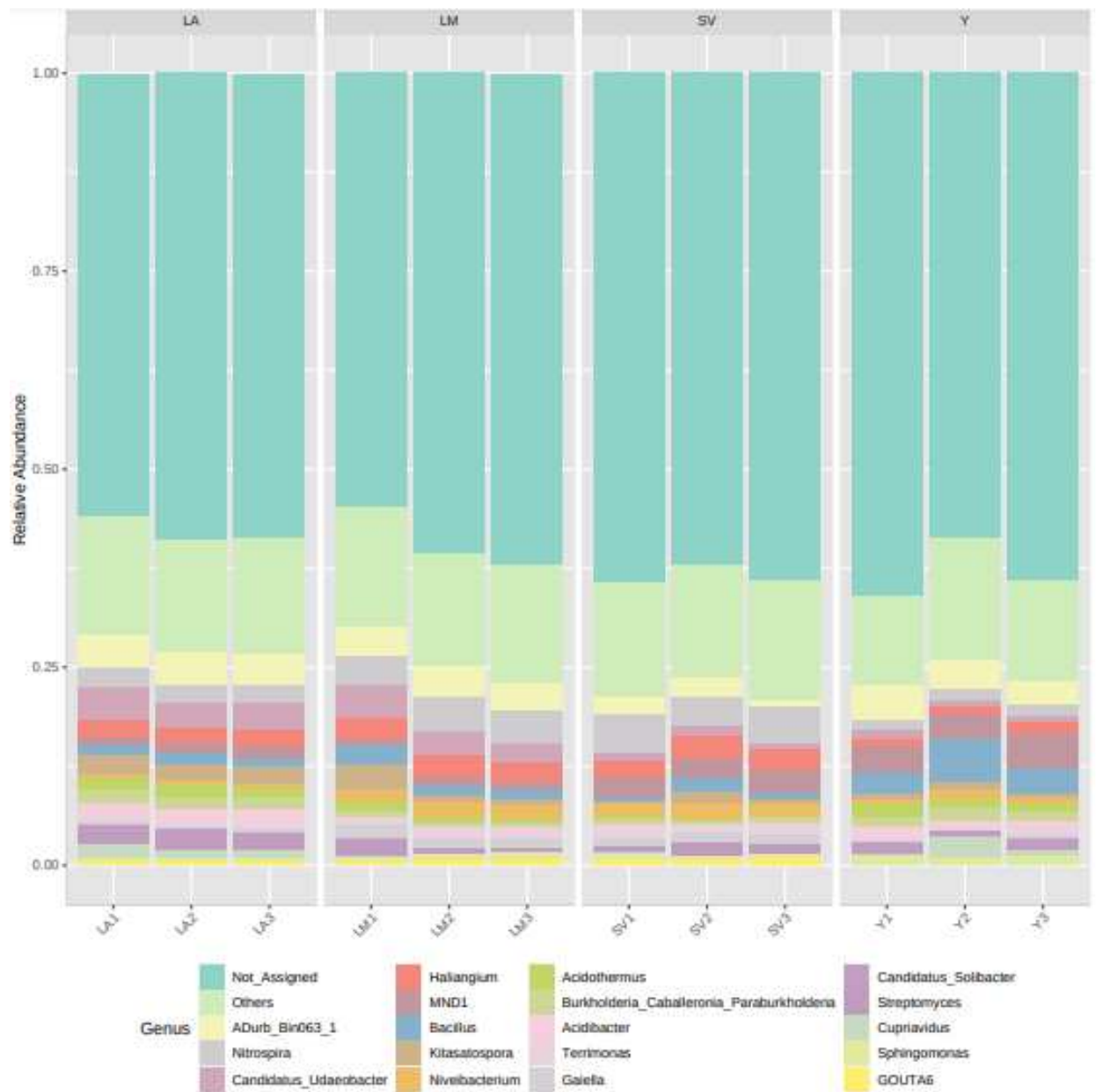


Figura 6. Histograma de la estructura taxonómica de las comunidades de suelo a nivel de género. Argentina (LA); Siempre Viva (SV); Los Medios (LM); Yariguies (Y).

3.4.4. Medida de la alfa-diversidad de los suelos

Para analizar la alfa-diversidad de las muestras de suelos cacaoteros, se calculó los índices de riqueza (Observed, Chao1), diversidad (Shannon, Simpson) y dominancia de ASV's cuyos valores encontrados no exceden a 30, 3 y 0.8 respectivamente (fig. 7), los cuales son considerados bajos comparados con suelos sin presencia de metales pesados, estos resultados sugieren una perturbación sobre la diversidad microbiana y la potencial especialización o dominancia de algunas comunidades. De acuerdo con el análisis ANOVA, hay diferencias estadísticamente significativas de las comunidades bacterianas presentes en las muestras. Respecto al análisis de correlación Pearson, se encontró que los índices de Shannon y Simpson, cuentan con una correlación positiva frente a MO, C, pH, Mn, C.I.C.E., Ca, P y negativamente correlacionados con S.

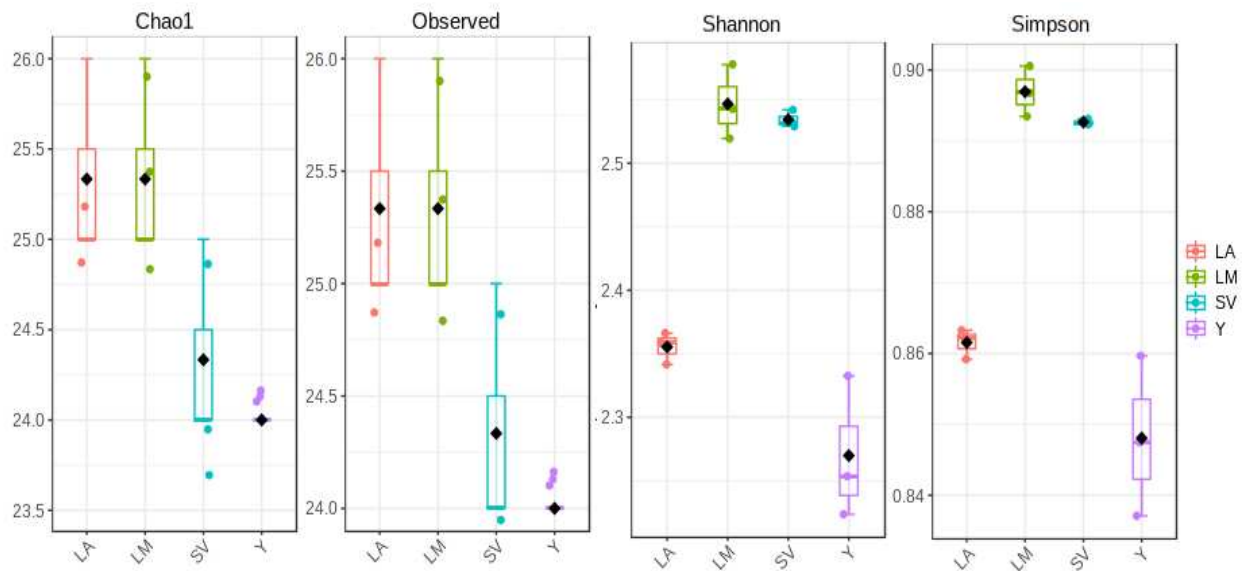


Figura 7. Alfa-diversidad de ASV's para las muestras de suelos analizados. Argentina (LA); Siempre Viva (SV); Los Medios (LM); Yariguies (Y).

3.4.5. Beta-diversidad de las muestras de suelos cacaoteros

De acuerdo con la medición de beta-diversidad, no se observó divergencia en la composición de ASV's entre las muestras (Fig. 8).

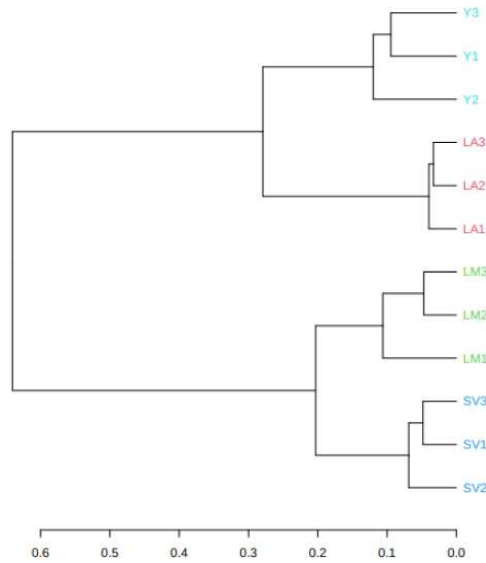


Figura 8. Análisis agrupamiento jerárquico de los ASV's a nivel de filo. Argentina (LA); Siempre Viva (SV); Los Medios (LM); Yariguies (Y).

Con respecto a la estructura de comunidades bacterianas, se realizó un análisis de componentes principales (PCoA) basado en el análisis de permutación múltiple PERMANOVA y disimilitud Bray-Curtis ($F = 14.595$, $p < 0.001$), el cual reveló que independiente de la concentración de Cd presente en las muestras de suelo, el primer eje (61.8%) las separa de acuerdo con el pH neutro y el segundo eje (23.4%) a las muestras de suelo con pH ácido (fig. 9).

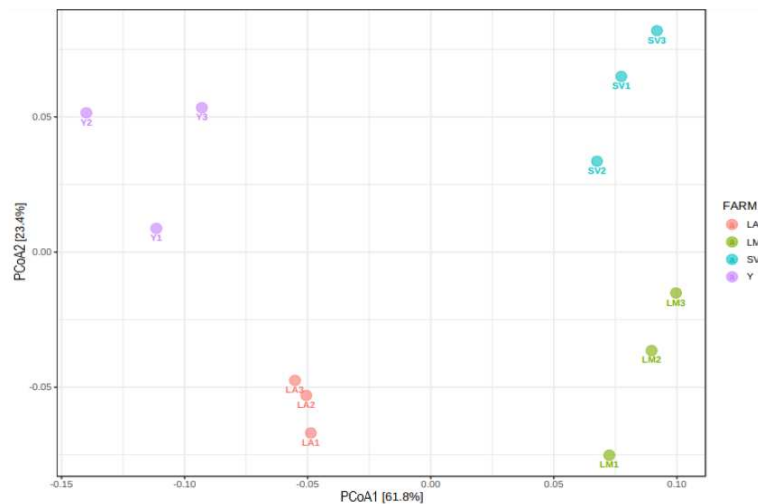


Figura 9. Análisis de componentes principales (PCoA) de disimilitud Bray-Curtis de los ASV's a nivel de filo. Argentina (LA); Siempre Viva (SV); Los Medios (LM); Yariguies (Y).

En cuanto a las características taxonómicas a nivel de género, se calculó la significancia estadística usando el método de discriminación lineal (LDA). La estimación de los coeficientes de correlación para la abundancia relativa de los 25 generos de mayor abundancia es ilustrada en la figura 10.

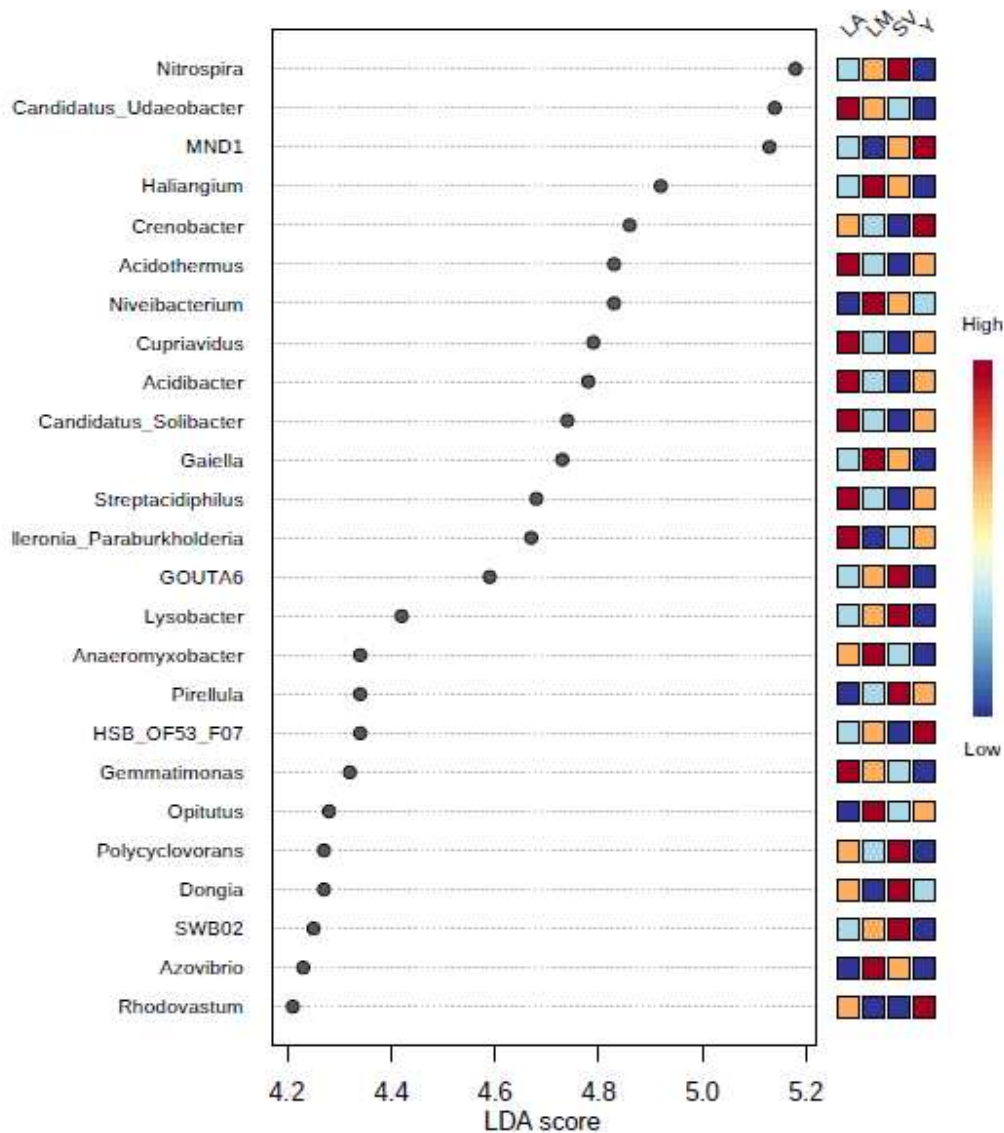


Figura 10. Gráfica del análisis discriminante lineal (LDA) muestra la diferenciación en el patrón taxonómico de las muestras a nivel de género. La escala de color representa la abundancia de cada filo en las fincas, rojo indica alta abundancia y azul baja abundancia. Argentina (LA); Siempre Viva (SV); Los Medios (LM); Yariquies (Y).

3.4.6. Asociación entre las comunidades bacterianas y propiedades de suelos

3.4.6.1. Análisis de redundancia (RDA)

Se realizó análisis de redundancia entre la variación de las comunidades bacterianas identificadas por técnicas dependiente e independiente de cultivo y las variables edáficas de los suelos. 11 propiedades fisicoquímicas (S, pH, C.E., Mg, Na, K, P, OM, C, Ca, C.I.C.E) se muestran en el RDA y de acuerdo con la prueba de correlación Spearman, para las comunidades bacterianas se encontró correlación positiva frente a K, MO, C, Ca, pH ($p < 0.01$) y P, C.I.C.E ($p < 0.05$) (fig.11).

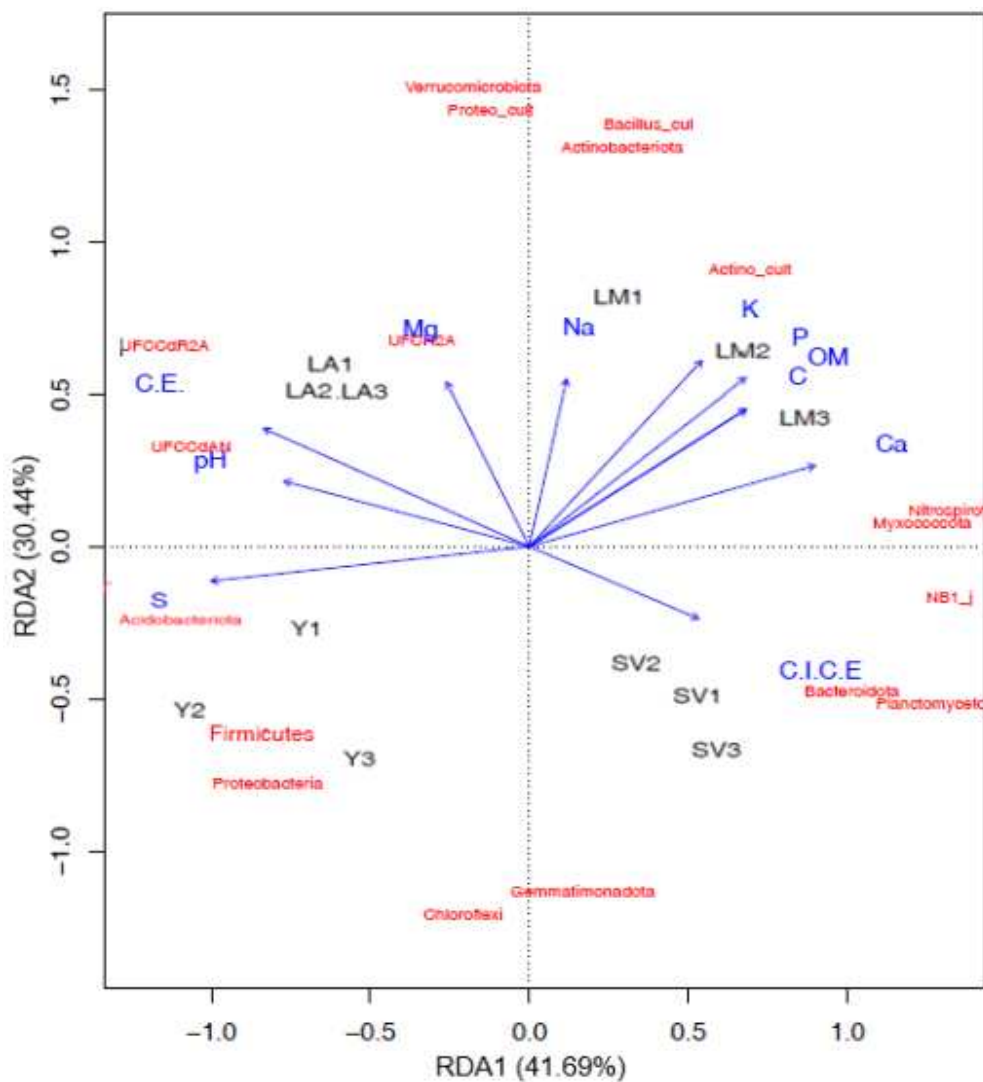


Figura 11. Análisis Redundancia (RDA) entre propiedades de suelo y abundancia de comunidades de suelo Argentina (LA); Siempre Viva (SV); Los Medios (LM); Yariguies (Y).

3.4.6.2. Heatmap.

La correlación Spearman se usó para investigar la relación entre las propiedades de suelo, concentración de Cd y la abundancia relativa de comunidades bacterianas (fig. 12). Los resultados señalan para los filos Planctomycetota, Mixococcota, NB1_J, Nitrospirota, Bacteroidota presentaron correlación positiva con K, MO, C, Ca, pH, P y C.I.C.E ($p < 0.01$). En cuanto a la abundancia de los filos Actinobacteriota, Proteobacteria, Firmicutes y Acidobacteriota presentaron correlación negativa frente a K, MO, C, Ca, pH, P y C.I.C.E ($p < 0.05$). Respecto a Cd, se encontró correlación negativa frente a Firmicutes y correlación positiva con Bacteroidota ($p < 0.05$).

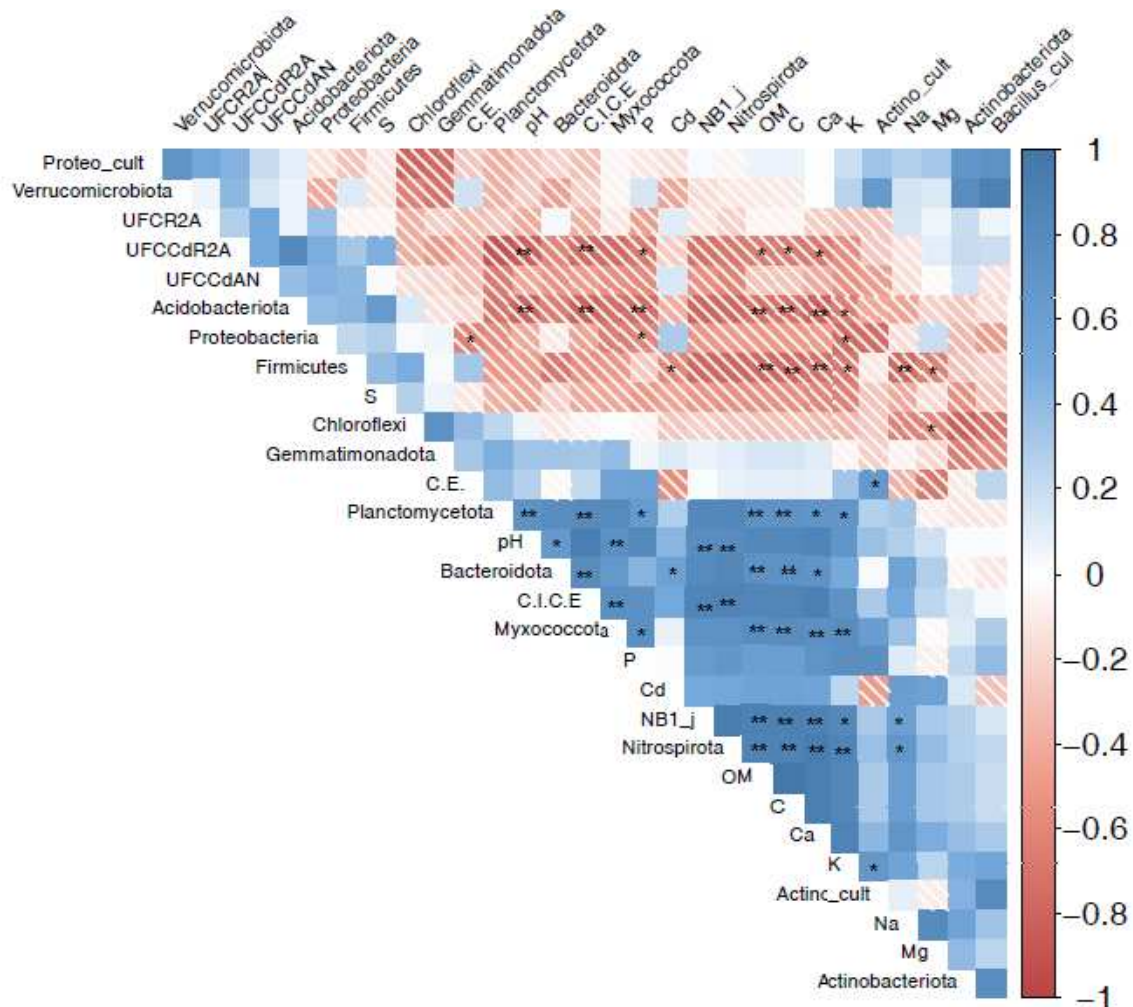


Figura 12. Heatmap de la correlación Spearman entre las propiedades de suelo y abundancia de comunidades de suelo. Argentina (LA); Siempre Viva (SV); Los Medios (LM); Yariguies (Y). ** $p < 0.01$; * $p \leq 0.05$.

3.4.7. Comunidad central

En cuanto a la comunidad común entre las muestras de suelo a nivel de género, se identificó a 16 géneros distintos, resaltando la presencia de 3 géneros identificados por técnicas dependientes de cultivo (*Bacillus* sp., *Burkholderia* sp. y *Cupriavidus* sp.) (fig. 13).

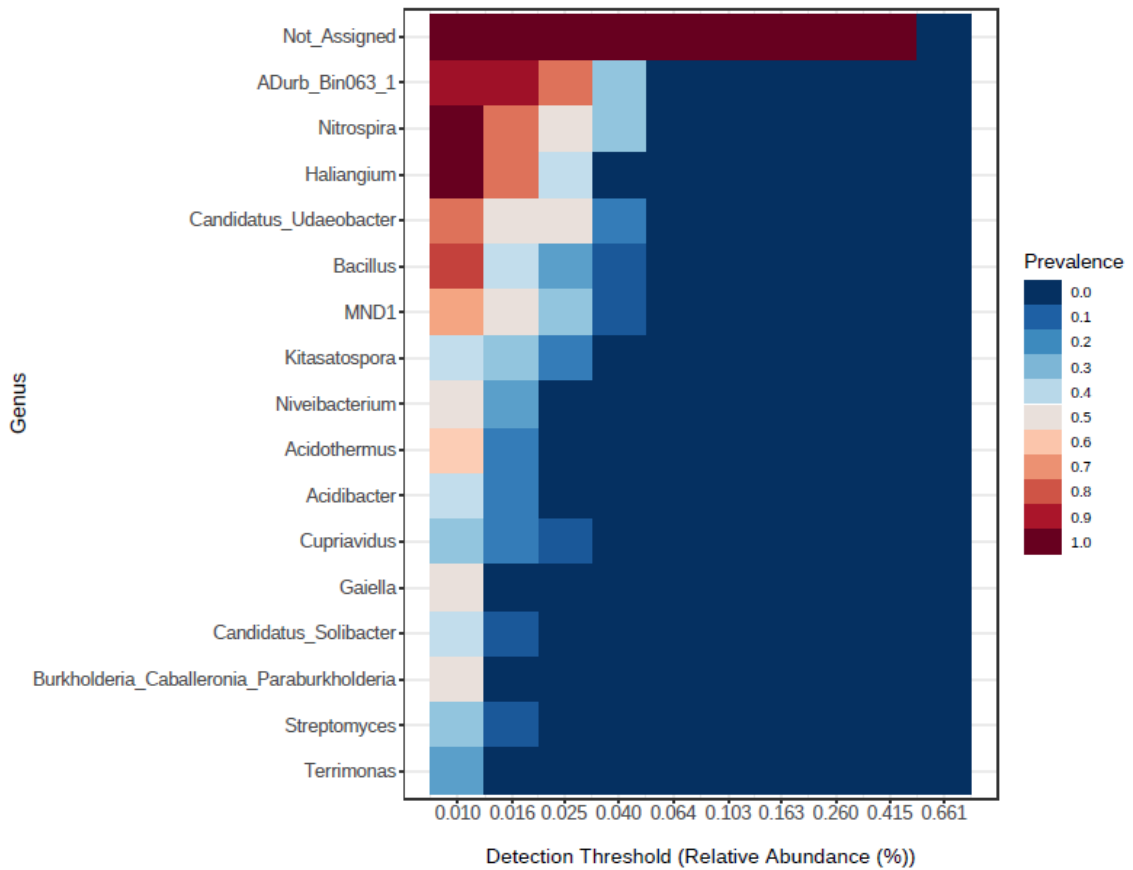


Figura 13. Heatmap muestra el análisis de comunidad central de todas las muestras. El microbioma central estimó los géneros comunes asociados a las muestras. Los colores señalan el nivel de prevalencia mayor desde Café claro (p-value >0.5), mientras que el azul claro menor prevalencia (p-value <0.5). El porcentaje de abundancia relativa se muestra en el eje x y los taxa a nivel de género en el eje y.

DISCUSIÓN

El suelo es un ecosistema de alta complejidad en el que habitan múltiples especies de organismos en total interacción. El conocimiento de la diversidad del suelo, particularmente de la fracción bacteriana es limitada, dado que una fracción menor de las especies microbianas han sido cultivadas (Joseph et al., 2003). El suelo presenta una gran diversidad de comunidades bacterianas que contribuyen al ciclo de nutrientes, salud y estructura, aspectos claves de la fertilidad que contribuyen al sostenimiento de las especies vegetales, que a su vez influyen en el crecimiento bacteriano, dado por la exudación radicular y partes senescentes de las plantas que son fuente de nutrientes para las comunidades microbianas (Atlas y Bartha, 2001). Sin embargo, aún existen preguntas sin resolver en cuanto a la composición y estructura de las comunidades bacterianas edáficas, dado que esta caracterización es un gran desafío y se requiere de la integración de múltiples estrategias que ofrece la ecología microbiana para profundizar en su conocimiento (Gómez et al., 2011).

De acuerdo con los resultados del muestreo, permitió establecer la correlación entre la concentración de Cd frente a las propiedades del suelo para 8 fincas cacaoteras de Santander, cuyos resultados son similares a lo reportado por Engbersen et al., (2019). Dada la complejidad del suelo como sistema vivo y cambiante, es importante planificar la manera de realizar el muestreo, así como determinar el área o zona, la profundidad, el número de muestras y réplicas; por lo anterior y en base a la información recopilada del muestreo, se seleccionó 4 fincas de acuerdo con el pH y la concentración de Cd en suelo, además se estimó estadísticamente el número de submuestras que conformaron cada una de las muestras compuestas (bajo un error relativo estimado del 20%, $n = 18$).

En cuanto al muestreo de las fincas seleccionadas, se realizó aplicando las técnicas habituales para validar la concentración de elementos intercambiables con los cuales se define la calidad agrícola del suelo, sumado a cuidados especiales de empaque y logística de conservación de las muestras finales para mantener sin modificaciones considerables a los elementos del suelo, evitar cambios bruscos en la diversidad bacteriana y la posible degradación del ADN total.

En cuanto a los resultados fisicoquímicos y en específico de las características de textura, las cuales son importantes al momento de determinar los planes de fertilización del cultivo,

absorción de nutrientes y evitar residuos de fertilizantes que puedan llegar a contaminar fuentes acuíferas, las fincas presentaron textura franco arcillosa, la cual permite retener agua y nutrientes. En cuanto a la deficiencia de MO, P y K, es posible que sea una señal de agotamiento de la fertilidad del suelo o que en estos suelos de ladera o pendiente pronunciada se presente el fenómeno de erosión por escorrentía y deforestación para el establecimiento de otros cultivos, a su vez, las variaciones de concentración de Ca, P, K, Mg se dan por la presencia de minerales ricos en calcita y fosfatos de calcio, que fluctúan de acuerdo con la altura de las fincas, sumado al antagonismo entre Ca frente a Mg y K, el cual origina un desequilibrio entre las bases intercambiables, afectando su disponibilidad en el cultivo a mediano plazo; en el mismo sentido, se detectó para todas las fincas una deficiencia de Mg, lo que afecta el rendimiento y calidad comercial de la semilla de cacao cosechada (Uribe et al., 2019). Otra explicación del fenómeno es por lo general se tiene la concepción en que el suelo es un ambiente rico en nutrientes, pero la realidad mostró que es altamente heterogéneo y con la opción de presentar microambientes con bajas concentraciones de nutrientes y compuestos orgánicos e inorgánicos que sirven como sustrato óptimo para el desarrollo de grupo de microorganismos oligótrofos que se adaptan a estos ambientes, degradando la baja cantidad de materia orgánica y en la dinámica de nutrientes (Hashimoto et al., 2006).

Por su parte, el Cd presente en las fincas evaluadas translocó a las plantas de cacao y se acumuló en las hojas, mazorcas y almendras, lo que perjudica la producción y rendimiento del cultivo, en especial para las fincas SV y LA (datos no mostrados). Algunos de los factores de suelo que influyen en la movilidad del Cd se encuentran pH, MO, C.I.C.E., variables fisicoquímicas que presentaron correlación significativa positiva. De acuerdo con Shanying et al., 2015, refiere que el pH es el factor más importante que afecta la disponibilidad y movilidad de Cd en el suelo, teniendo más movilidad a pH entre 4.5 – 5.5, mientras que a pH neutro y alcalino se convierte en formas de carbonato insoluble y fosfato. En cuanto a la materia orgánica (MO) es la mayor fuente de cationes de intercambio, capacidad quelante y promoción de la actividad microbiana; precisamente por su capacidad de intercambio catiónico, hace que la MO absorba altas concentraciones de Cd, cuyo incremento en el porcentaje de MO mediante enmiendas o fertilización, puede reducir la biodisponibilidad del Cd a su vez la de aumentar el pH del suelo (Kirkham, M., 2006).

Las comunidades bacterianas del suelo son un componente esencial del ecosistema, independiente si el suelo presenta problemas de contaminación geogénica o antropogénica, lo que aún no se sabe es cual es el manejo de los microorganismos para mejorar la fertilidad del suelo y como las comunidades bacterianas responderán a la contaminación de metales pesados (Fierer, N., 2017). Lo anterior se hace más complejo de responder si los suelos de estudio presentan contenidos variables de metales pesados de origen natural y que son usados por muchos años para cultivar plantas acumuladoras de estos metales, plenamente adaptadas a este tipo de ambientes. Es por ello que la caracterización de las comunidades microbianas es el primer paso en el camino de desenredar la complejidad del suelo en cuanto a su microbioma. La investigación planteó el estudiar una parte del microbioma como lo es la composición de las comunidades bacterianas de suelos cacaoteros en presencia de Cd geogénico y las interacciones con las propiedades fisicoquímicas.

Dado lo anterior, es importante para la observación del crecimiento de los microorganismos, la adecuada selección de los medios de cultivos, que según Casado et al., (2012) es una de las técnicas más importantes en la identificación de microorganismos provenientes de diferentes muestras, es considerada una metodología clásica donde se obtiene una alta variedad de morfotipos que posteriormente pueden ser estudiados, sumado a la optimización de los medios de cultivo, se pueden recuperar microorganismos de lento crecimiento o que poseen condiciones específicas de desarrollo (Casado et al., 2012).

Para las muestras de suelo e independiente de los medios de cultivo empleados y de la concentración de Cd presente en los suelos, de acuerdo con el análisis de varianza, no hubo diferencia significativa en los recuentos obtenidos ($p > 0.05$). Es importante indicar que las muestras de suelo fueron extraídas en la gotera de árboles de cacao fitosanitariamente sano, zona que no está cerca de la rizosfera, parte en la cual interaccionan los microorganismos con la raíz de la planta y donde se realizan múltiples reacciones de intercambio de nutrientes, lo cual hace que se incrementen los recuentos y multiplicidad de géneros bacterianos (VanDamme, N. et al., 2016). En el mismo sentido, estudios sobre la microbiota de suelo en condiciones de baja concentración de Cd, han mostrado recuentos de bacterias mesófilas en promedio de 1.2×10^7 UFC/g (Bravo et al., 2018); en nuestro estudio se encontró recuentos menores bajo las condiciones empleadas,

resultados que están directamente relacionados con las propiedades de suelos, las cuales indican que son suelos de baja calidad para el cultivo y requieren de intervención agronómica o de mejoramiento en sus prácticas agrícolas. De acuerdo con Nelino et al., (2019), reportó recuentos bajos antes de los tratamientos de compost y fertilización sobre los niveles de microorganismos en suelo cultivado con cacao y la presencia de Cd, lo que da pie a confirmar que la presencia del factor contaminante Cd interfiere en el crecimiento bacteriano.

De acuerdo con los resultados del recuento total de bacterias es síntoma que las muestras de suelo presentan variaciones en composición de materia orgánica y sustancias inorgánicas, contenido de agua, disponibilidad de oxígeno y nutrientes o fuentes de carbono, así como el pH del suelo (Kief et al., 1987; Madigan et al., 2006), sumado a la presencia de Cd como factor contaminante, en especial este último, va a ejercer cambios sobre la estructura de la comunidad por la dominancia de grupos particulares, causados por la presión selectiva que de por sí ejercen los metales pesados; al mismo tiempo, el Cd es promotor de la sobrevivencia y crecimiento de poblaciones que se adaptan a la contaminación con Cd y finalmente al cambio en la composición de las comunidades microbianas en general (Lazzaro, A., et al., 2006; Liu et al., 2020).

Al momento de aislar y purificar bacterias es importante considerar que las condiciones de siembra sean similares a las del entorno natural, sin embargo, es difícil lograrlo, dado que aspectos como la química del hábitat de la bacteria, las interacciones con los factores bióticos y abióticos, la diversidad de microorganismos y los cambios en el clima confieren alta variabilidad, sumado a las funciones en el ecosistema a nivel microbiano y los posibles errores en el cultivo en cuanto al establecer los medios de selección adecuados según la concentración de nutrientes y las condiciones de incubación (Pham y Kim, 2012). De acuerdo con lo anterior, se propuso aislar colonias heterótrofas tolerantes a Cd, empleando dos medios de cultivos diferentes en cuanto a fuentes de carbono y concentración de nutrientes (microorganismos oligótrofos por su habilidad de crecer en ambientes bajos en nutrientes y copiótrofos por su habilidad de crecer en ambientes altos en nutrientes). Además de los medios, se estableció incorporar cloruro de Cd como agente selectivo de crecimiento, dado el interés de obtener colonias tolerantes al metal para su posterior caracterización.

En cuanto al número de colonias tolerantes a Cd aisladas en los distintos medios de cultivo comercial difiere considerablemente (tabla 4), dado que en agar nutritivo se logró aislar un número mayor frente al medio R₂A (59% de las colonias se aislo en AN y 41% en agar R₂A), esta diferencia se debe a la concentración de nutrientes, lo que favorece el crecimiento de ciertos géneros bacterianos como es el caso de las bacterias heterótrofas (Latorre, N., 2007). Según lo indicado en la tabla 5, las fincas la Argentina y Yariguies, cuyas características de pH de suelo son ácidas, se diferencian en cuanto a la concentración de Cd total y materia orgánica, se observa una mayor riqueza de género en la finca la Argentina; En cuanto a las fincas Siempre Viva y los Medios, las caracteriza pH cercano a la neutralidad pero diferente concentración de Cd total y materia orgánica, se observa con mayor claridad una diferencia de riqueza de género a favor de la finca los Medios. Lo anterior está acorde con Lazzaro, A., et al., (2006), quien indica la predominancia de ciertos géneros cultivables influenciados por la concentración de Cd presente en el suelo.

Es importante evidenciar las características macroscópicas de las colonias aisladas, más aún cuando se trata de bacterias nativas, lo cual que permite su identificación fenotípica y ubicación taxonómica; algunos aislados cuentan con forma irregular, con elevación convexa baja, borde ondulado y coloración blanca-cremosa brillante, otras presentan forma puntiforme, elevación plana, borde ondulado, similar a una costra/precipitado; Colonias con borde regular pulvinadas, cremosas traslúcidas umbonadas con consistencia mucoide o lisa (Figura 3 y S2).

De acuerdo con el análisis molecular de los diferentes aislados tolerantes a Cd, el filo Proteobacteria fue uno de los más abundantes en las diferentes muestras. De acuerdo con Xiaoqi, L., et al., (2017), quien realizó un estudio de las comunidades microbianas en suelo con presencia de metales pesados, reporta resultados similares e incluso indica que este filo muestra un ligero aumento de géneros como respuesta a la presencia de la contaminación con metales pesados. Los estudios publicados respecto a comunidades bacterianas presentes en suelos cultivados con cacao son limitados, sin embargo, se confirmó que el filo Proteobacteria es el más abundante en la comunidad bacteriana cultivable de suelos con presencia de Cd (Bravo et al., 2018).

Para el filo Proteobacteria, los resultados permitieron identificar a los géneros *Burkholderia* sp., *Cupriavidus* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia* sp., *Klebsiella* sp., *Ralstonia* sp. y *Serratia* sp., resultados similares reportados para suelos contaminados con desechos industriales y donde las Proteobacterias se incrementan en respuesta a la polución con metales pesados (Xiaoqi et al., 2017). *Burkholderia* sp., ha sido aislada en suelos no rizosféricos con presencia de Cd (Jiang et al., 2008); *Cupriavidus* sp., ha sido aislado de suelos contaminados con metales pesados, cerca a zonas de explotación minera de zinc (Zoropogui et al., 2008) y en suelos contaminados con Cd sembrados con arroz (Siripornadulsil y Siripornadulsil, 2013); *Enterobacter* sp., aislado de suelos contaminados con Cd y se reporta por su capacidad de bioremediación del metal (Xu et al., 2017; Pramanik et al., 2018; Bhattacharya et al., 2018); de acuerdo con la investigación de Worden et al., (2009), las cepas de *Escherichia* sp. podrían tener incremento en la capacidad de tolerar Cd; en cuanto al género *Klebsiella* sp., se reportan para *Klebsiella pneumoniae* su tolerancia y acción frente a la toxicidad del Cd a través de la biotransformación en CdS inerte (Holmes et al., 1997). Park et al., (2008) refiere a *Ralstonia* sp.HM1 con capacidad de transformar Cd en CdS.

Por otra parte, para filo Actinobacteriota se aisló una cepa de *Dermacoccus* sp., que de acuerdo con Becerra-Castro, et al. (2011), identificó esta bacteria endofítica y rizosférica en *Cytisus striatus* con resistencia al Zinc. Para el filo Firmicutes, se encontró cepas que pertenecen a *Bacillus* sp. y algunas aisladas en sedimentos contaminados con Cd (Kim et al., 2015); Huang et al., (2013), reportó el aislamiento de *Bacillus cereus* RC-1 en suelos con Cd y su potencial de biosorción de Cd en células vivas o muertas como mecanismo de bioacumulación. En cuanto al género *Exiguobacterium* sp. ha sido reportado por Kumari et al., (2014) la capacidad de inmovilización de Cd en suelo por parte del género *E. undae* con capacidad de convertirlo en CdCO₃. Ziagova et al., 2007, aisló *Staphylococcus Xylosus* en suelos empleados en minería y reportó su capacidad de biosorción de Cd y Cr. Por su parte, Sheng et al., (2016) reportó la caracterización de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* aislada de calabazas fermentadas en presencia de 10 ppm de Cd, con capacidad de biosorción a nivel de pared celular.

Es de resaltar que, 5 de los 12 géneros bacterianos (*Burkholderia* sp., *Cupriavidus* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia* sp., y *Bacillus* sp.) caracterizados en este estudio, son consistentes a los hallazgos previamente reportados en suelos cultivados con cacao en

Boyacá, Santander y Arauca por Bravo et al., (2018). Sin embargo, los aislados se obtuvieron empleando técnicas de cultivo dependiente con único medio de cultivo (agar layer) a una concentración mínima de 6mg/L de CdCl₂. Estos resultados complementan la información para Colombia y amplía el número de cepas caracterizadas con capacidad adaptativa frente al contaminante con una tolerancia a Cd en concentraciones de 120 mg/L, lo que representa el primer reporte con esta capacidad para *Exiguobacterium* sp., *Ralstonia* sp., *Serratia* sp., *Dermacoccus* sp., *Klebsiella* sp., *Lactococcus* sp. y *Staphylococcus* sp., además de confirmar que existe una mayor diversidad de bacterias tolerantes a Cd presentes en suelos de fincas cultivadas con cacao en Colombia.

Adicional a su capacidad de acción frente a Cd, los géneros bacterianos cuentan con funciones importantes a nivel del suelo, para *Burkholderia* sp. se reporta la capacidad de fijar N y habilidad de biocontrol de algunas especies (Salles et al., 2006), *Cupriavidus* sp. como fijadora de N y formación de nódulos en raíz (Wolińska et al., 2017), *Enterobacter* sp. es una rizobacteria promotora de crecimiento de plantas, fijadora de N y solubilizador de P (Gupta et al., 2019), *Escherichia* sp. produce polisacáridos que interactúan entre bacteria, suelo y planta (Seo y Matthews, 2014), *Klebsiella* sp. es una bacteria fijadora de N, con la capacidad de degradar celulosa y lignina (Harindintwali et al., 2021), *Ralstonia* sp. Solubilizadora de P (Hirota et al., 2012), *Serratia* sp. es considerada una rizobacteria promotora de crecimiento de plantas y solubilizadora de P (Blanco-Vargas et al., 2020), *Dermacoccus* sp. produce metabolitos secundarios anti-protozoarios (Abdel-Magded et al., 2010), *Bacillus* sp. es considerado como rizobacteria promotora de crecimiento de plantas y mejorador de calidad de suelo (Sabaté et al., 2020), *Exiguobacterium* sp. cuenta con la capacidad de solubilizar fosfatos y promotor de crecimiento de plantas (Pandey and Bhatt, 2016), *Lactococcus* sp. es una bacteria fijadora de N, productora de bacteriocinas (Higdon et al., 2020) y *Staphylococcus* sp. es considerada como bacteria promotora de crecimiento de plantas (Zheng et al., 2020).

En cuanto a la estrategia cultivo independiente, se usó la secuenciación masiva de la región V4 del gen ARN ribosomal 16S, marcador molecular comunmente usado para este fin, lo cual permitió obtener el perfil de la estructura de la comunidad bacteriana. Sin embargo, es pertinente señalar que estas muestras de suelos cultivados con cacao presentan diferentes concentraciones de Cd geogénico, por ende, están bajo el estrés toxico de Cd, lo que adversamente influye en la diversidad y abundancia de

microorganismos (Fierer, 2017), más aún cuando los filos pertenecientes a las comunidades bacterianas se ajustan en respuesta a la concentración de Cd presente, con la disminución en el número de organismos con sensibilidad al metal e incrementando organismos tolerantes, cambiando la composición de la comunidad (Guo et al., 2017; Wang et al., 2017, Liu et al., 2020), incluso pudo darse una disminución en la diversidad y abundancia de las comunidades bacterianas por la presencia permanente de Cd a lo largo de los años de cultivo (Yin et al., 2015).

Los índices de diversidad reflejaron la composición de las comunidades bacterianas del suelo y su variación es una respuesta a los cambios ambientales, incluyendo contaminación con metales pesados y están relacionados con el nivel endémico y heterogeneidad (O'Brien et al., 2016), además del alto número de géneros bacterianos distribuidos en una frecuencia baja, son similares en todas las muestras independiente del contenido de Cd (Tabla 4). De acuerdo con Yin et al., 2019, lo anterior puede estar cercanamente relacionado con las diferentes comunidades bacterianas nativas en suelo y su tolerancia a Cd, así como la emergencia y desaparición de algunos de los grupos dominantes bajo el estrés de Cd.

Los resultados indican que es tal el grado de adaptación de las comunidades bacterianas, que no es posible predecir como responden a esta exposición, incluso no se encontró correlación de Cd frente a los índices de alfa-diversidad (Stuart et al., 2010). Se obtuvo, para los índices de diversidad (Shannon y Simpson), correlación positiva frente a propiedades redox (C.I.C.E, pH), sustancias orgánicas (MO, C) y minerales (Mn, Ca, P), asociadas por lo general con actividades biológicas y bacterianas (Fierer, 2017), resultados acordes a los reportados por Liu et al., (2020) y Wu et al., (2017).

Las comunidades bacterianas a nivel de filo fueron similares para los suelos de las cuatro fincas cacaoteras, incluso en base a la distancia Bray-Curtis se separan de acuerdo con la diferencia de pH del suelo. Los principales filos en su orden de abundancia relativa: Proteobacteria, Acidobacteriota, Actinobacteriota, Verrucomicrobiota, Myxococota, Chloroflexi, Placntomycetota y Bacteroidota han sido previamente reportados en suelos contaminados con Cd e incluso indican que Proteobacteria y Acidobacteriota podrían resistir la toxicidad del metal dependiendo de sus capacidades de complejación y adsorción (Liu et al., 2020; Luo et al., 2019; Wu et al., 2017; Buyer et al., 2017; Cao et al., 2020). No solo la concentración de Cd puede influir en la diversidad y abundancia bacteriana del

suelo, las condiciones fisicoquímicas como la concentración de C, pH, C.I.C.E., P, K y la riqueza de predadores microbianos (Ryan et al., (2009); Liu et al., (2020)), lo anterior se interpreta como la posibilidad de aislar e identificar bacterias nativas resistentes al metal.

Wu et al., 2017 y Liu et al., (2020) señalan que la carencia de diferencia estadísticamente significativa del análisis de alfa-diversidad (Shannon y Simpson) y de las comunidades bacterianas de suelo a nivel de filo frente a los niveles de Cd en suelo, se debe a que la diversidad microbiana tuvo una débil correlación con Cd, lo que permitió a muchos microorganismos la opción de tolerar varios niveles de toxicidad de Cd a través de distintos mecanismos como precipitación extracelular, adsorción a nivel de pared celular, oxidación enzimática y acomplejación intracelular.

En cuanto a algunas funciones en suelo de los principales filos identificados, el filo Proteobacteria es ampliamente diverso a nivel morfológico, fisiológico y metabólico, tiene participación importante en los ciclos de carbono, nitrógeno y azufre (Spain et al., 2009). La presencia del orden Betaproteobacteriales, Myxococcales, Rhizobiales, NB1-j, y Desulfarculares, han sido reportados con un incremento en la abundancia relativa del filo Proteobacteria en sedimentos de río en presencia de Cd (Xue et al., 2018). Para Acidobacteriota, este filo puede usar fuentes de carbono como pectinas, almidones y quitina, participando en el metabolismo de nitrógeno (Zang et al., 2014). El filo Actinobacteriota es importante en la degradación de residuos, en la formación de materia orgánica y la producción de metabolitos secundarios (Lewin et al., 2016). Verrucomicrobia es un filo relacionado con la fertilidad de suelos cultivados (Navarrete et al., 2015), y Planctomycetes cuenta con características diferenciadas como la ausencia de peptidoglicano en su pared celular y su metabolismo es principalmente quimioheterotrófico (Chodak et al., 2013).

Respeto a los géneros bacterianos con mayor abundancia relativa (>0.5%), se identificó a *Nitrospira*, *Udaeobacter*, *Haliangium*, *Cupriavidus*, MND1, *Bacillus*, *Kitasatospora*, *Niveibacterium*, *Acidothermus*, *Burkholderia*, *Acidibacter*, *Terrimonas*, *Gaiella*, ADurb.Bin063-1, *Solibacter*, *Kitasatospora*, *Sphingomonas*, *Streptomyces*. Estos géneros han sido relacionados con procesos de tolerancia a Cd, por ejemplo, Feng et al., (2018), reportó a los siguientes géneros de suelos contaminados con Cd: *Nitrospira*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Solibacter*, *Cupriavidus*; en cuanto a géneros endofíticos de tabaco transgénico tolerantes a Cd: MND1, *Ralstonia*,

Sphingomonas, *Streptomyces* (Wang et al., 2021), Lazzaro et al., (2008) identificó a los géneros *Streptomyces* y *Kitasatospora* en suelos forestales con Cd; géneros *Solibacter*, ADurb.Bin063-1 y *Acidibacter* presente en suelos con presencia de metales pesados (As, Pb, Cd, Zn) aledaños a mina de cobre abandonada (Chun et al., 2021); Ma et al., (2020) reportó a *Burkholderia* y *Gaiella* en suelos cercanos a minas de Sb; en cuanto al género *Udaeobacter* se reportó como el género más abundante en suelos con presencia de Zn, Cd, Ni y Cu colindantes a una mina de cobre abandonada (Böhmer et al., 2020); géneros como *Nitrospira* y *Haliangium* identificados en suelos sembrados con trigo contaminados con Cd (Song et al., 2020); Duan et al., (2020) monitoreó los cambios en las comunidades bacterianas de suelos en presencia de distintas concentraciones de Cd y reportó la presencia de *Acidothermus* y *Terrimonas*; el género *Kitasatospora* cuenta con tolerancia a metales pesados (Ni, Zn y Cu) de acuerdo con lo publicado por Yun et al., (2020).

En contexto, mediante las técnicas cultivo dependiente e independiente se obtuvo resultados complementarios en la caracterización de la comunidad bacteriana de suelos cultivados con cacao bajo presencia de Cd geogénico; se identificó por cultivo dependiente a los filos Proteobacteria, Firmicutes y Acidobacteriota, mientras que por secuenciación masiva extendió la comunidad microbiana a Proteobacteria > Acidobacteriota > Actinobacteriota > Verrucomicrobiota > Myxococcota > Chloroflexi > Plactomycetota > Bacteroidota > Gemmatimonadota > Nitrospirota > Firmicutes > NB1_J. En ambas técnicas, Proteobacteria fue el filo dominante en las muestras de suelos. A nivel de género, mediante cultivo dependiente se aisló e identificó a *Burkholderia* sp., *Exiguobacterium* sp., *Ralstonia* sp., *Bacillus* sp., *Cupriavidus* sp., *Serratia* sp., *Dermacoccus* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia* sp., *Klebsiella* sp., *Lactococcus* sp. y *Staphylococcus* sp. Por cultivo independiente, se identificó a 149 géneros, 6 de los cuales coincidieron para ambas metodologías (% abundancia relativa) (*Burkholderia* sp. (0.90%), *Ralstonia* sp. (0.04%), *Bacillus* sp. (1.98%), *Cupriavidus* sp. (0.75%), *Serratia* sp. (0.02%), *Klebsiella* sp. (0.05%)).

Con la finalidad de identificar biomarcadores a nivel de género para los suelos de cada una de las fincas, se realizó el análisis discriminante lineal junto con el tamaño del efecto (LDA-LEfSe). De acuerdo con la figura 10, las fincas LA, LM, SV, Y tuvieron en su orden 8, 6, 7 y 4 diferentes taxa con un puntaje LDA mayor a 4. A nivel de género para SV, *Nitrospira*

(Nitrospirota) fue el taxón con mayor diferenciación, seguido de GOUTA6 (Proteobacteria), *Lysobacter* (Proteobacteria), *Pirellula* (Planctonmycetota), *Polycyclovorans* (Proteobacteria), *Dongia* (Proteobacteria), SWB02 (Proteobacteria). Para la finca LA el taxa diferenciador fue *candidatus Udaeobacter* (Verrucomicrobiota), *Acidothermus* (Actinobacteriota), *Cupriavidus* (Proteobacteria), *Acidibacter* (Proteobacteria), *candidatus Solibacter* (Acidobacteriota), *Streptacidiphilus* (Actinobacteriota), *Burkholderia* (Proteobacteria), *Gemmatimonas* (Gemmatimonadotas). En cuanto a la finca LM, *Haliangium* (Myxococcota), *Niveibacterium* (Proteobacteria), *Gaiella* (Actinobacteriota), *Anaeromyxobacter* (Myxococcota), *Opitutus* (Verrucomicrobiota), *Azovibrio* (Proteobacteria) y para Y el mayor taxa fue MND1 (Proteobacteria) seguido de *Crenobacter* (Proteobacteria), HSB-OF53-F07 (Chloroflexi), *Rhodovastum* (Proteobacteria). Estos hallazgos indican que los suelos cacaoteros con presencia de Cd geogénico cuentan con géneros bacterianos resistentes al metal, lo que ocasiona reensamblaje de las comunidades bajo el nivel de estrés de Cd, sumado a la pérdida de bacterias sensibles al metal, lo que puede generar microambientes.

En cuanto al efecto de las propiedades del suelo sobre las comunidades bacterianas identificadas por métodos dependiente e independiende de cultivo, están correlacionadas significativamente con variables como el pH, C.I.C.E, materia orgánica, carbono y minerales P, K, Ca; sin embargo, no se encontró diferencia significativa de la concentración de Cd en los suelos cacaoteros, probablemente se deba a la permanente presencia del metal en suelo, lo que generó mecanismos de tolerancia por parte de los géneros bacterianos (Liu et al., 2020). Según Ma et al., (2020) el pH y los nutrientes del suelo tienen efecto indirecto sobre las comunidades bacterianas, e incluso, los efectos de las propiedades de suelo y los metales pesados fue mayor en suelos con pH neutro, mientras que el pH tuvo un mayor impacto en suelos con pH ácido. Los resultados señalan que, de acuerdo con el pH de los suelos cacaoteros, hay cierta diferencia en cuanto a la abundancia relativa de los principales filos de la comunidad bacteriana de las fincas LA y Y (pH ácido) frente a las fincas LA y SV (pH neutro), probablemente esta neutralidad del suelo influyó en la proliferación de géneros bacterianos eutróficos, lo que causa la disminución de la abundancia de otras cepas (Ma et al., 2020; Mohapatra et al., 2011); además, los nutrientes del suelo pueden ayudar a los microorganismos a resistir la toxicidad de los metales pesados e incrementar el metabolismo bacteriano (Gundacker et

al., 2010), lo anterior se confirma de acuerdo con la correlación de los filos de mayor abundancia relativa de la comunidad bacteriana frente a las propiedades de suelos (Fig.12)

La comunidad central o común son comunidades bacterianas presentes en todas las muestras y pueden jugar un papel fundamental en el funcionamiento del ecosistema, siendo las bacterias indicativo de fenómenos que ocurren en el ambiente (Pereira et al., 2015). En este caso, la comunidad central fue definida por los ASV's presentes en todas las muestras de suelo. El género *Nitrospira* sp. está ubicuamente distribuido en hábitats óxicos y representan la predominancia conocida que oxida nitritos en la naturaleza, el cual cataliza el segundo paso de nitrificación y además son esenciales para el ciclo biogeoquímico del nitrógeno (Daims, H., 2014). A pesar de contar con baja abundancia relativa, se logró identificar géneros bacterianos presentes en todas las muestras y que concuerdan con la identificación de géneros aislados mediante cultivo dependiente como *Cupriavidus* sp. que pertenece al filo Proteobacteria, produce metabolitos como oxalatos, fosfatos, sulfitos para inmovilizar y disminuir la acumulación de Cd en cultivos de arroz (Shi et al., 2020). Otro género en común entre las técnicas empleadas fue *Bacillus* sp. reportado con actividad frente a contaminantes, en especial Cd y con capacidades metabólicas de carbono (Chi et al., 2020) y el género *Burkholderia* sp. es promotora de crecimiento de plantas resistente a metales pesados incluyendo Cd, que bajo su influencia incrementa la actividad de enzimas antioxidantes como catalasa y la superóxido dismutasa (Ma et al., 2020). En cuanto al género ADurb.Bin063-1 (Verrucomicrobiota), está asociado a la degradación de carbohidratos y *Haliangium* sp. degrada compuestos orgánicos y procesos de desnitrificación (Wang et al., 2019).

El género candidato *Udaeobacter* es colonizador de suelos oligotóxicos y cuenta con la capacidad para sobrevivir y replicarse por adquirir aminoácidos y vitaminas del suelo (Venkatachalam et al., 2021). Género MND1 (Proteobacteria) prevalece en suelos tanto moderada como altamente contaminados con metales pesados, asociados con ciclo del nitrógeno (Chun et al., 2021) y *Kitasatospora* asociado con procesos de solubilización de fósforo (Tchakounté et al., 2018). Para el género *Acidothermus* cuenta con la presencia de genes requeridos para el metabolismo del carbono (Gosai et al., 2018). Respecto a *Acidibacter* y *Streptomyces*, Wang et al., (2021) señala a estos géneros como bacterias endofíticas resistentes a Cd; en cuanto a *Gaiella*, se relaciona su incremento de abundancia relativa dada su correlación frente a actividad de sucrasa, ureasa y fosfatasa alcalina en suelos con presencia de Cd (An et al., 2021). Según Niu et al., (2021) reportó

a candidatus *Solibacter* como género dominante en procesos de fitoremediación en macetas empleando a mostaza indú y pasto festuca alta en presencia de Cd; *Terramonas* no solamente cuentan con la capacidad de tolerar Cd, sino que incrementó su abundancia relativa que beneficia al crecimiento de la planta (She et al., 2021)

CONCLUSIONES

Este trabajo adiciona información a los estudios para comprender los aspectos de la interacción de las comunidades bacterianas asociadas a suelos cacaoteros con diferentes concentraciones de Cd geogénico del departamento de Santander, Colombia. Las estrategias de métodos de cultivo dependiente e independiente se complementan en la identificación y aumento en la variedad de comunidades bacterianas detectadas o registradas hasta el momento en este ambiente. Se encontraron los filos Proteobacteria, Actinobacteria y Firmicutes con predominancia en todas las muestras de suelo por las dos estrategias. Dentro de los filos identificados, se caracterizaron varias cepas de diferentes géneros con tolerancia a altos niveles de Cd (120 mg/L). Se reporta como novedoso el aumento en el número de cepas nativas de *Exiguobacterium* sp., *Ralstonia* sp., *Serratia* sp., *Dermacoccus* sp., *Klebsiella* sp., *Lactococcus* sp. y *Staphylococcus* sp. con capacidad de tolerar mayor concentración de Cd. Adicionalmente, es de resaltar el nuevo reporte hasta donde tenemos conocimiento de la cepa de *Dermacoccus* spp. (Fig.S6) con esta capacidad y considerar su potencial en futuros estudios de facultad inhibitoria del metal.

Se encontró que la composición de la comunidad bacteriana está correlacionada de manera significativa con propiedades del suelo, donde pH, MO y Cd total fueron los mayores factores de variación. La combinación de diferentes técnicas en esta investigación ofrece un nuevo enfoque con respecto a la evaluación de comunidades bacterianas en suelos cultivados con cacao bajo estrés de Cd en Colombia, aportando información para reconocer el papel ecológico de las comunidades bacterianas en trabajos futuros de bioprospección, con el objetivo de estudiar sus características específicas de tolerancia o retención de Cd.

Current Research in Microbial Sciences

Theobroma cacao agricultural soils with natural low and high cadmium (Cd) in Santander (Colombia), contain a persistent shared bacterial composition shaped by multiple soil variables and bacterial isolates highly resistant to Cd concentrations.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	CRMICR-D-21-00084
Full Title:	Theobroma cacao agricultural soils with natural low and high cadmium (Cd) in Santander (Colombia), contain a persistent shared bacterial composition shaped by multiple soil variables and bacterial isolates highly resistant to Cd concentrations.
Article Type:	Research Paper
Corresponding Author:	Pedro Feria, M.Sc. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín: Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín COLOMBIA
Corresponding Author's Institution:	Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín: Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín
First Author:	Pedro Felipe Feria, M.Sc.
Order of Authors:	Pedro Felipe Feria, M.Sc. Lucas Penagos Vélez, PhD Howard Junca, PhD Claudia Ximena Moreno-Herrera
Keywords:	Bacterial diversity; cadmium (Cd); contaminated soil; 16S rRNA survey; Theobroma cacao
Manuscript Classifications:	10.001.022: Gram Negative Bacteria; 10.001.023: Gram Positive Bacteria; 10.003: Bacterial Population; 30: Applied Microbiology; 70.002: Bacterial Genetics; 70.009: Metagenomics; 110.002: Environmental Microbiome; 120: Microorganism
Abstract:	Heavy metals can be found in soil as natural components or as product of contaminations events; plants growing in soils are prone to bioaccumulate heavy metals on their biomass; Theobroma cacao is able to bioaccumulate cadmium (Cd) in the seed and could had in derived food products, considered a human health risk; therefore, removal Cd is desirable but not vet technically and economically feasible; only to avoid Cd in cocoa is by selecting lands plots exhibiting lower Cd concentrations in soils, imposing a serious limitation to farmers and regulators. The study of bacterial communities and isolation bacteria with tolerance and mechanisms to counteract the translocation Cd to the parts of cocoa plant exhibits high relevance in Colombia economy and especially to companies producing chocolate and derivatives. Here, we explore bacterial community associated with soils having relatively high natural Cd concentrations in large agricultural cocoa plot located in Santander region. We characterized the bacterial communities' compositions by amplicon 16S rRNA sequencing from metagenomics soil DNA and by culturing-based enumeration and isolation approaches. Our results reveal that alpha-diversity bacterial composition did not exhibit significant changes across soils with Cd concentrations ranging 0.2–6 mg/L. We observed statistically significant differences in beta-diversity between soil properties, including Cd concentrations, and the presence of a core community among the samples. Mantel test showed that bacterial community structure significantly correlated with C, OM, P, S, Ca, Mn and Cd. Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Planctomycetes, Gemmatimonadetes and Nitrospirae were the most abundant phyla in all samples and the Chitinophagaceae, Geobacteraceae and Nitrospiraceae dominated the core microbiome. Culture-dependent techniques allowed the isolation of bacterial strains tolerating high Cd concentrations up to 120 mg/L for potential Cd biosorption or intracellular sequestration. Among the isolates, we found a peculiar Dermacoccus sp. strain with such capability provides the first insight regarding their it. The combination of different approaches offers new clues regarding the assessment of bacterial communities in

Capítulo 2

TOLERANCIA E INMOBILIZACION DE CADMIO (Cd) POR PARTE DE BACTERIAS NATIVAS AISLADAS EN SUELOS CACAOTEROS CON PRESENCIA DEL METAL

RESUMEN

La presencia de Cadmio (Cd) natural como contaminante del ambiente, especialmente en suelos, cuenta con un serio riesgo de salud a través de la cadena alimentaria. Las bacterias han sido aplicadas en la bioremediación de Cd en ambientes contaminados mediante interacciones como biosorción o bioacumulación; este proceso es considerado como una alternativa amigable con el medio ambiente. En el presente capítulo, doce bacterias nativas tolerantes a $2500 \mu\text{M}$ de CdCl_2 (120mg/L Cd) se caracterizaron por su habilidad para tolerar e inmovilizar Cd en medio líquido, mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y espectro EDX. Adicionalmente, el cambio en los grupos funcionales en la superficie celular fue realizado por espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR). Las cepas presentaron crecimiento retrasado con prolongación de la fase lag comparado con la curva de crecimiento en ausencia del metal, además se evidenciaron cambios en la morfología celular, precipitación citoplasmática e interacción con los grupos funcionales de la pared celular, lo que permitió diferentes eficiencias de captura de Cd bajo las condiciones de incubación realizados, cuyos resultados demostraron la capacidad de inmovilizar este metal por parte de bacterias nativas.

PALABRAS CLAVES

Bacterias, Cadmio, TEM, FT-IR, EDX.

1. INTRODUCCION

Cadmio (Cd) es uno de los metales pesados presentes en la corteza terrestre, se encuentra en forma de sales, cuya toxicidad crónica, tanto en humanos y ambiente ha sido ampliamente documentada, llegando a recomendaciones por parte de la Organización Mundial de la Salud, como ingesta diaria máxima de 2.5 mg/Kg. (Zao et al., 2015). Las bacterias son un grupo amplio de microorganismos con gran diversidad de vías metabólicas, fisiológicas, y estructuras de resistencia, que las hacen propicias para aprovechar cualquier recurso y sobrevivir a condiciones extremas que se pueden encontrar en la atmósfera, como la radiación, desecación, altas temperaturas, presencia de metales pesados, entre otras (Griffin et al., 2007). En cuanto al ambiente del suelo, la mayoría de microorganismos que lo habitan cuentan con la capacidad de solubilizar formas insolubles de minerales que pueden contener metales pesados los cuales, por la secreción de ácidos orgánicos, pueden ser liberarlos al suelo y muchas de las bacterias del suelo son tolerantes a metales pesados y juegan un papel predominante en la movilización de estos metales (Gadd, G., 1990; Nies, D., 1999; Nies, D., 2003). Los microorganismos y en especial las bacterias, cuentan con varios mecanismos de defensa para superar la toxicidad por Cd, los cuales podrían ser usados para la remediación de este metal pesado presente en el suelo. Existe Información respecto a comunidades microbianas aisladas de suelo en distintos países asiáticos y europeos, haciendo especial énfasis en su comportamiento a nivel de biosorción y bioacumulación de Cd (Ceribasi et al., 2001; Rajdeep, C. and Pataki, C., 2012; Siripornadulsil and Siripornadulsil, 2013; Veglio, F. and Beolchini, F., 1997; Villanueva, L., 2005; Vijayaraghavan, K., and Yun, Y., 2008; Yadav, S. K., 2010; Tossapol et al., 2015).

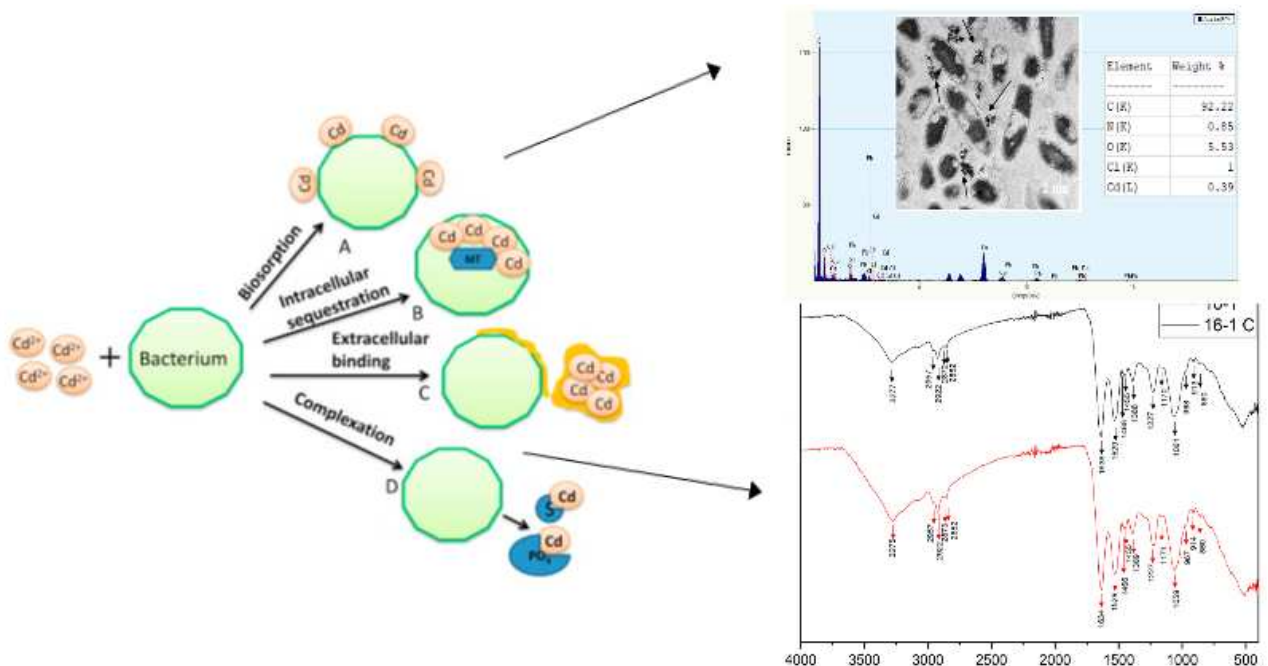
Las bacterias acumulan metales pesados como resultado de procesos metabólicos normales vía intercambio en las paredes celulares, reacciones de complejación en las paredes celulares o precipitación intra-extracelular. La adsorción por grupos iónicos sobre la superficie celular es el primer mecanismo para la absorción del metal por biomasa inactiva. La acumulación en biomasa ha mostrado ser más efectiva que algunas resinas de intercambio iónico para remoción de metales del agua (Wong and Cobbett, 2009). En la mayoría de las células microbianas exhiben características coloidales en la absorción de los metales o hidrolizan los metales de forma similar a óxidos minerales propios del suelo (Yadav, S. K., 2010). La biosorción de los metales es afectada por muchos factores

como el pH, temperatura, concentración y tipo de biomasa, presencia de diferentes iones metálicos en disolución, tiempo de contacto, etc. Un gran número de microorganismos como bacterias, hongos, levaduras y algas han sido reportados para ligar una variedad de metales en diferentes soluciones (Siripornadulsil and Siripornadulsil, 2013). Las bacterias tienen preferencias como bioabsorbentes más que otros microorganismos porque a) cuentan con mayor área superficial y radio en volumen, b) un alto contenido de sitios de quimiosorción, así como ácido teicoico en sus paredes celulares, c) abundantes en todos los ambientes como agua, suelo y aire.

Los iones metálicos en solución son absorbidos sobre la superficie bacteriana a través de interacciones con grupos químicos funcionales como son los carboxilatos, aminas, amidas, imidazol, fosfatos, tioeter, hidroxilos y otros grupos funcionales encontrados en los polímeros de las paredes celulares (Zao et al., 2015). Los sitios de unión del metal son diferentes de acuerdo con las especies microbianas y metal; la mayoría de los estudios de biosorción están enfocados principalmente sobre la selección de microorganismos resistentes a metales a partir de ambientes contaminados, más aún cuando los microorganismos de suelos contaminados con metales tienen desarrolladas tolerancias para los metales y probablemente incrementa la capacidad de biosorción de los metales (Veglio and Beolchini, 1997).

La contaminación del ambiente con metales ha llevado a la aparición de microorganismos resistentes al metal en el suelo y agua en regiones industriales, además es importante explorar microorganismos de ambientes para usarlos en biosorción de metal (Wong and Cobbett, 2009). Los cultivos de cacao están siendo afectados por niveles de Cd y recibe toda la atención en llevar a cabo estudios para identificar factores que imparten altas concentraciones de Cd en almendras para Latinoamérica (Engbersen et al., 2019). La presencia de Cd en suelos cultivados con cacao causa problemas de abastecimiento y limita las áreas disponibles para cultivar cacao (suelos con baja concentración de Cd), lo cual afecta la producción y procesamiento del chocolate y derivados, así como las ventas locales y exportaciones cumpliendo con regulaciones de concentración en Cd (Chavez et al., 2015).

El objetivo del estudio fue evaluar la tolerancia y comportamiento de doce especies bacterianas nativas tolerantes a Cd en ensayos invitro, y cuyo mecanismo de acción fue identificado por Microscopía electrónica de transmisión (TEM). Además, el espectro obtenido por espectroscopia infrarrojo transformada de Fourier (FT-IR) confirmó fuertes interacciones de Cd sobre la estructura bacteriana; mientras tanto para 4 de ellas indican presencia intracelular de Cd; en 4 bacterias la presencia de Cd está por fuera de la célula y 2 bacterias cuentan con interacción de Cd con la pared celular. Las especies de estos géneros bacterianos nativos cuentan con un potencial de aplicación para interactuar con metales pesados en especial con Cd presente en suelos cultivados con cacao.



2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Bacterias nativas empleadas

Las bacterias nativas usadas fueron previamente aisladas a partir de suelo no rizosférico cultivado con cacao en presencia de Cd. Las cepas fueron purificadas hasta obtener un cultivo puro y luego almacenados en crioviales con 10% de glicerol (v/v) a -20°C. Las bacterias seleccionadas identificadas taxonómicamente se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Homología de las secuencias ADNr 16S de las bacterias nativas tolerantes a Cd.

Código	Afiliación filogenética	Número acceso a Genbank
10-2	<i>Bacillus toyonensis</i>	MN587894
17-1	<i>Burkholderia arboris</i>	MN587896
15-1	<i>Cupriavidus necátor</i>	MN587892
4-2	<i>Escherichia fergusonii</i>	MN587901
11-4A	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	MN587893
16-1	<i>Ralstonia solanacearum</i>	MN587895
6-2	<i>Serratia marcescens</i>	MN587899
4-3	<i>Dermacoccus barathri</i>	MN587890
29-4B	<i>Enterobacter tabaco</i>	MN587891
18-4B	<i>Klebsiella variicola</i>	MN587897
22-4	<i>Lactococcus lactis</i>	MN587898
2-3	<i>Staphylococcus capitis</i>	MN587900

2.2. Efecto del cadmio sobre el crecimiento bacteriano.

A cada una de las 12 bacterias se realizó un inóculo (50 mL) cultivado a 32°C por 24 horas hasta alcanzar una densidad óptica 1.0 a 600 nm (2×10^7 UFC m/). Se inocularon al 1% v/v en caldo nutritivo a 32°C en un shaker (150 rpm) en diferentes concentraciones de Cd (0, 10 y 15 mg/L), las cuales corresponden a niveles de Cd encontrados en suelos cultivados con cacao e indicados en el capítulo uno. El crecimiento de las bacterias se determinó cada tres horas midiendo, por triplicado, la densidad óptica a 600 nm. Como

bacteria control positivo fue usada *Cupriavidus metallidurans* DSM 2839 (Siripornadulsil and Siripornadulsil, 2013). De acuerdo con Madigan, M., et al., 2012, se calculó para la fase de crecimiento exponencial y para cada una de las cepas bacterianas, la constante μ , o la tasa de crecimiento específico (velocidad de crecimiento por unidad de biomasa) y por unidad de tiempo (h^{-1}),

$$\log N - \log N_0 = \mu / 2,303 (t-t_0)$$

el tiempo que tarda en duplicarse la población o tiempo de generación, g.

$$g = 0,693/\mu$$

Al inverso del tiempo de generación se le denomina velocidad de crecimiento (K) y sus dimensiones, son generaciones/hora.

$$K = 1/g$$

2.3. Determinación de Cd removido por las bacterias nativas

La suspensión de células en crecimiento (2.5 mL) se inoculó en caldo de cultivo (Merck®) (250 mL), modificando la concentración de Cd presente en el medio dependiendo del nivel de tolerancia de la bacteria, y se incubó a 32°C por 24 horas sin ajustar pH. Todas las células fueron precipitadas por centrifugación y lavadas tres veces con agua desionizada estéril, después las muestras fueron lavadas con 10mM EDTA estéril para remover el exceso de Cd que pudo unirse a la superficie celular. El supernadante y los pellets celulares después de centrifugado fueron usados para medir Cd total mediante absorción atómica de flama. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los valores promedios con desviación estándar fueron reportados (Huang et al.2014); además, se evaluó la habilidad de cada bacteria de bioacumular Cd con el cálculo del factor de bioacumulación (FB), el cual se define como su relación entre la concentración del elemento en la biomasa celular comparada por la concentración del elemento en el medio de cultivo (Ferreira et al., 2017).

$$FB = [\text{Metal}]_{\text{biomasa celular}} / [\text{Metal}]_{\text{medio de cultivo}}$$

2.4. Estudio TEM y EDX

Las células bacterianas fueron obtenidas por centrifugación a 6000 x g por 5 minutos, fueron lavadas tres veces con agua desionizada estéril, después, fueron fijadas en glutaraldehído al 2.5% en buffer fosfato (pH 7.2) por 4 horas y luego lavadas tres veces con el mismo buffer, seguido por su posterior fijación con tetróxido de osmio al 1% por 2 horas en buffer fosfato (pH 7.2) Las células fueron deshidratadas con alcohol etílico y depositadas en una resina ERL. Para observaciones de ultraestructura, secciones con espesor de 50-60 nm fueron obtenidas empleando ultramicrotomo (Ultracut E, Leica, Alemania) con un cuchillo de diamante y luego depositadas en placas de cobre. Las secciones fueron teñidas con acetato de urilo al 2% por 1 hora y luego fijadas con citrato de plomo por 15 minutos. Las estructuras celulares fueron observadas y fotografiadas por microscopio electrónico de transmisión con análisis simultáneo de EDX (Chen et al., 2019).

2.5. Análisis de espectros infrarrojos transformada de Fourier (FT-IR)

Las cepas incubadas tanto en presencia como ausencia de Cd (0, 10 y 15 mg/L de acuerdo con la metodología 2.3) por 24 horas a 32°C. Las células bacterianas fueron colectadas por centrifugación (4000 x g. por 10 minutos), luego se lavaron tres veces con agua desionizada estéril y resuspendidas. Las muestras fueron liofilizadas y depositadas sobre un plato de KBr y luego escaneadas por un espectrofotómetro Infrarrojo AVATAR 360 FT-IR (Thermo Nico-let, USA) con parámetros por defecto de acuerdo con el fabricante. La resolución de cada espectro infrarrojo fue de 4 cm⁻¹ y longitud de onda desde 4000 hasta 450 cm⁻¹ (Li et al., 2019).

3. RESULTADOS

3.1. Evaluación del crecimiento de las bacterias nativas

Las curvas de crecimiento de las 12 bacterias evaluadas en caldo nutritivo con y sin Cd son presentadas en la figura 1. Con excepción de las bacterias *Staphylococcus* sp. (2-3) y *Dermaococcus* sp. (4-3), las demás cuentan con tolerancia a Cd en concentraciones entre 10 y 15 mg/L. La rata de crecimiento de las bacterias en presencia de Cd fue levemente menor cuando no se cuenta con Cd, incluso se observa que algunas bacterias mostraron con mayor claridad las fases de crecimiento (fase exponencial/latencia). En cuanto al tiempo de latencia, se observa que es corta, lo cual hace suponer que estas bacterias cuentan con la maquinaria celular adecuada para enfrentar al contaminante y alcanzar la fase exponencial rápidamente. En la tabla 2 se resumen los valores μ , g y K obtenidos.

Tabla 2. Parámetros de crecimiento bacteriano.

Bacteria	μ (h ⁻¹)		g (h)		K (generación/h)	
	Sin Cd	Con Cd	Sin Cd	Con Cd	Sin Cd	Con Cd
<i>Serratia</i> sp. (6-2)	0,076	0,089	9,142	7,388	0,109	0,128
<i>Cupriavidus</i> sp. (15-1)	0,089	0,106	7,760	6,519	0,129	0,153
<i>Klebsiella</i> sp. (18-4B)	0,099	0,126	7,007	5,491	0,143	0,182
<i>Bacillus</i> sp. (10-2)	0,100	0,094	6,944	7,388	0,144	0,135
<i>Ralstonia</i> sp. (16-1)	0,123	0,065	5,639	10,728	0,177	0,093
<i>Escherichia</i> sp. (4-2)	0,066	0,074	10,548	9,365	0,095	0,107
<i>Enterobacter</i> sp. (29-4B)	0,111	0,104	6,249	6,657	0,160	0,150
<i>Cupriavidus metallidurans</i> (R)	0,093	0,058	7,492	11,907	0,133	0,084
<i>Exiguobacterium</i> sp. (11-4A)	0,115	0,144	6,005	4,806	0,167	0,208
<i>Burkholderia</i> sp. (17-1)	0,062	0,082	11,124	8,441	0,090	0,118
<i>Lactococcus</i> sp. (22-4)	0,240	0,392	2,885	1,769	0,347	0,565

3.2. Bioacumulación de Cd por parte de las bacterias nativas

En la tabla 2 se resume el comportamiento de las bacterias y su factor de bioacumulación (FB) luego de 24 horas de inoculación en caldo nutritivo suplementado con Cd. Con excepción de la cepa *Serratia* sp. (6-2), el FB para las demás es alto, lo que indica que cuentan con capacidad para acumular Cd.

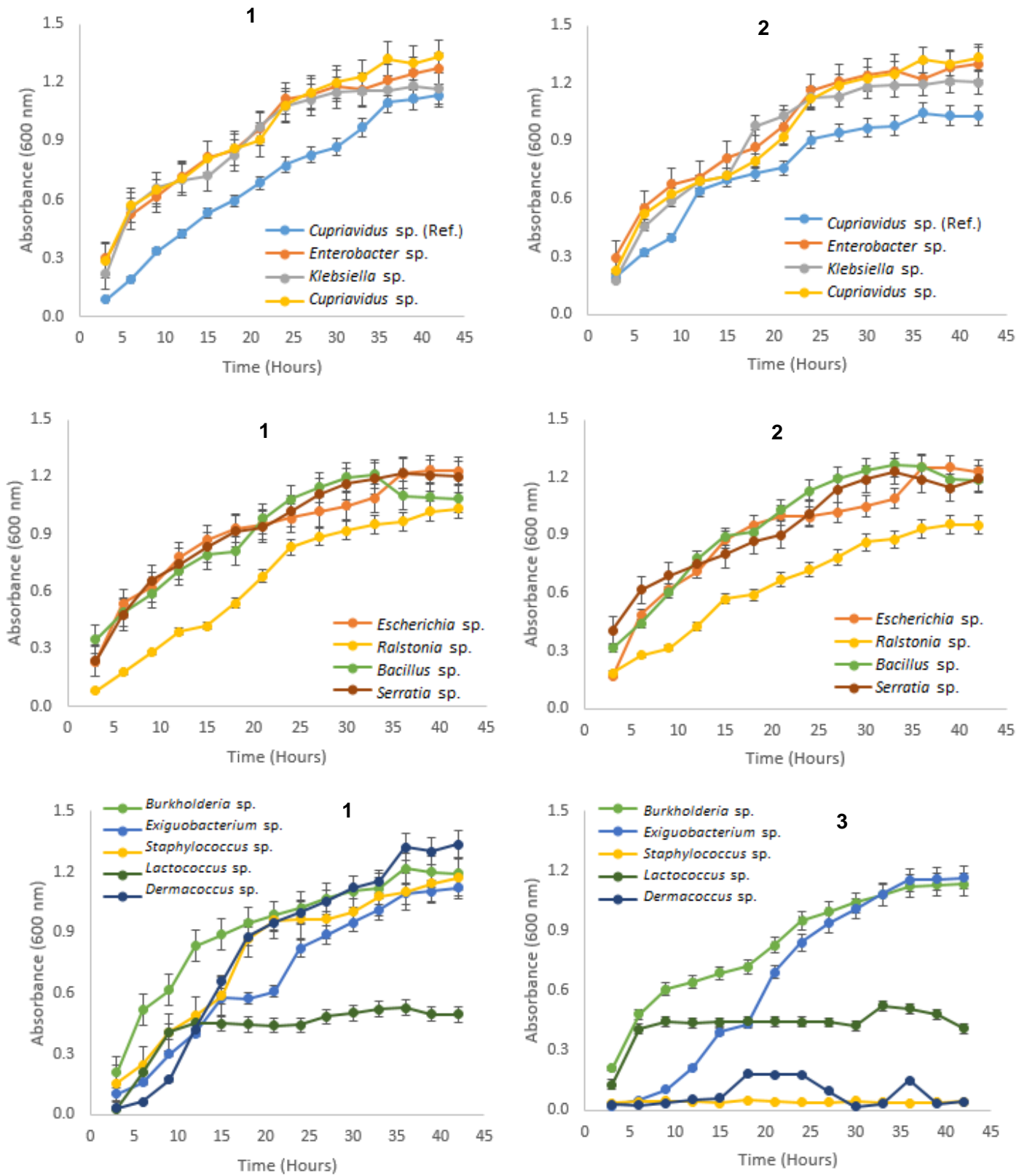


Figura 1. Curvas de crecimiento bacterias nativas. 1: 0mg/L Cd, 2: 15 mg/L Cd, 3: 10 mg/L.

Tabla 3. Capacidad de bioacumulación de las bacterias nativas en caldo nutritivo

Cepa nativa	Concentración inicial de Cd (mg/L)	Tinción de Gram	pH Caldo Nutritivo	Concentración de Cd en supernatante (mg/L)	Concentración de Cd capturado (mg/L)	% Cd capturado	Factor Bioacumulación (FB)	Habilidad de bioacumulación de Cd
<i>Serratia</i> sp. (6-2)		-	6.25 ± 0.17	3.14 ± 0.09	0.28 ± 0.10	8.02 ± 2.73	0.07 ± 0.03	Extracelular
<i>Cupriavidus</i> sp. (15-1)		-	6.88 ± 0.30	2.38 ± 0.06	0.78 ± 0.14	24.61 ± 3.35	0.21 ± 0.04	Intracelular
<i>Klebsiella</i> sp. (18-4B)		-	6.60 ± 0.38	0.69 ± 0.08	2.59 ± 0.40	78.86 ± 2.97	0.69 ± 0.11	Intracelular
<i>Bacillus</i> sp. (10-2)		+	6.34 ± 0.23	2.20 ± 0.09	0.87 ± 0.19	28.21 ± 5.37	0.23 ± 0.05	Extracelular
<i>Ralstonia</i> sp. (16-1)	3.73 ± 0.31	-	6.62 ± 0.25	1.41 ± 0.19	2.17 ± 0.21	60.59 ± 5.59	0.58 ± 0.06	Extracelular
<i>Escherichia</i> sp. (4-2)		-	6.22 ± 0.42	1.50 ± 0.21	1.78 ± 0.39	53.93 ± 9.09	0.48 ± 0.11	Intracelular
<i>Enterobacter</i> sp. (29-4B)		-	6.73 ± 0.44	1.56 ± 0.05	1.39 ± 0.04	47.16 ± 1.40	0.37 ± 0.01	Extracelular
<i>Cupriavidus metallidurans</i> (R)		-	6.36 ± 0.41	1.70 ± 0.11	1.61 ± 0.07	48.63 ± 0.49	0.43 ± 0.02	Intracelular
<i>Exiguobacterium</i> sp. (11-4A)		+	5.14 ± 0.38	2.92 ± 0.03	0.90 ± 0.09	28.24 ± 2.0	0.24 ± 0.02	Extracelular
<i>Burkholderia</i> sp. (17-1)	3.22 ± 0.27	-	6.06 ± 0.20	2.50 ± 0.05	0.68 ± 0.02	21.33 ± 2.21	0.18 ± 0.01	Intracelular
<i>Lactococcus</i> sp. (22-4)		+	5.16 ± 0.19	1.73 ± 0.04	1.51 ± 0.18	46.38 ± 3.45	0.40 ± 0.05	Extracelular

3.3. Microscopía TEM, Energía dispersiva de rayos X (EDX) y espectros FT-IR

3.3.1. Resultados Microscopía TEM

Microscopía electrónica de transmisión fue usada para determinar la localización de la acumulación del metal en las bacterias nativas (Figura 2 y 3). Para las bacterias nativas *Serratia* sp. (6-2), *Exiguobacterium* sp. (11-4A), *Ralstonia* sp. (16-1), *Enterobacter* sp. (29-4B), *Lactococcus* sp. (22-4) y *Bacillus* sp. (10-2) se observan gránulos densos de Cd en la parte exterior y células presentan alteración o deformación morfológica (Figura 2 parte 1, 2 y 3). Para las bacterias *Burkholderia* sp. (17-1), *Cupriavidus* sp. (15-1), *Escherichia* sp. (4-2), *Klebsiella* sp. (18-4B) y para la bacteria de referencia *Cupriavidus metallidurans* DSM2839 (R); Los gránulos densos de Cd se localizan en el citoplasma presentando deformación morfológica (Figura 3 parte 1 y 2). Es interesante reseñar que las bacterias *Staphylococcus* sp. (2-3) y *Dermacoccus* sp., en específico la bacteria *Staphylococcus* sp. produce una sustancia viscosa con textura pegajosa (exopolisacárido), la cual posiblemente interacciona o encapsula el Cd y protege a las células de lisis o destrucción celular a las concentraciones evaluadas, incluso luego de 72 horas de contacto en caldo nutritivo con 15 mg/L de Cd y la *Dermacoccus* sp. (4-3) cuenta con una coloración amarillo-naranja intenso, esta bacteria no presentó crecimiento a ninguna concentración de Cd, pero el pellet celular del inóculo se mantuvo suspendido sin destruirse luego de 48 horas de contacto en caldo nutritivo con 15 mg/L de Cd (Figura 4).

3.3.2. Espectros EDX

Se evidencia en los espectros de la derecha los picos de identificación de Cd, alrededor de 3.2 a 3.4 KeV, rango normal para este metal pesado y cambia su intensidad (conteo) en diferentes formas de bioacumulación típicos para el metal. Otros metales presentes en los picos de los espectros fueron C, O, Cl, Pb, Si, Os y Cu; junto con picos de Cl, ya que la fuente de Cd es cloruro de Cd grado analítico (CdCl_2). Cl, C, O y Si son elementos comunes de la pared celular; los picos de Os y Cu provienen de los tratamientos de fijación y tinción de contraste de las muestras. En la mayoría de espectros para las cepas bacterianas, se detectó un incremento de oxígeno después de la biosorción de Cd (Fig. 5).

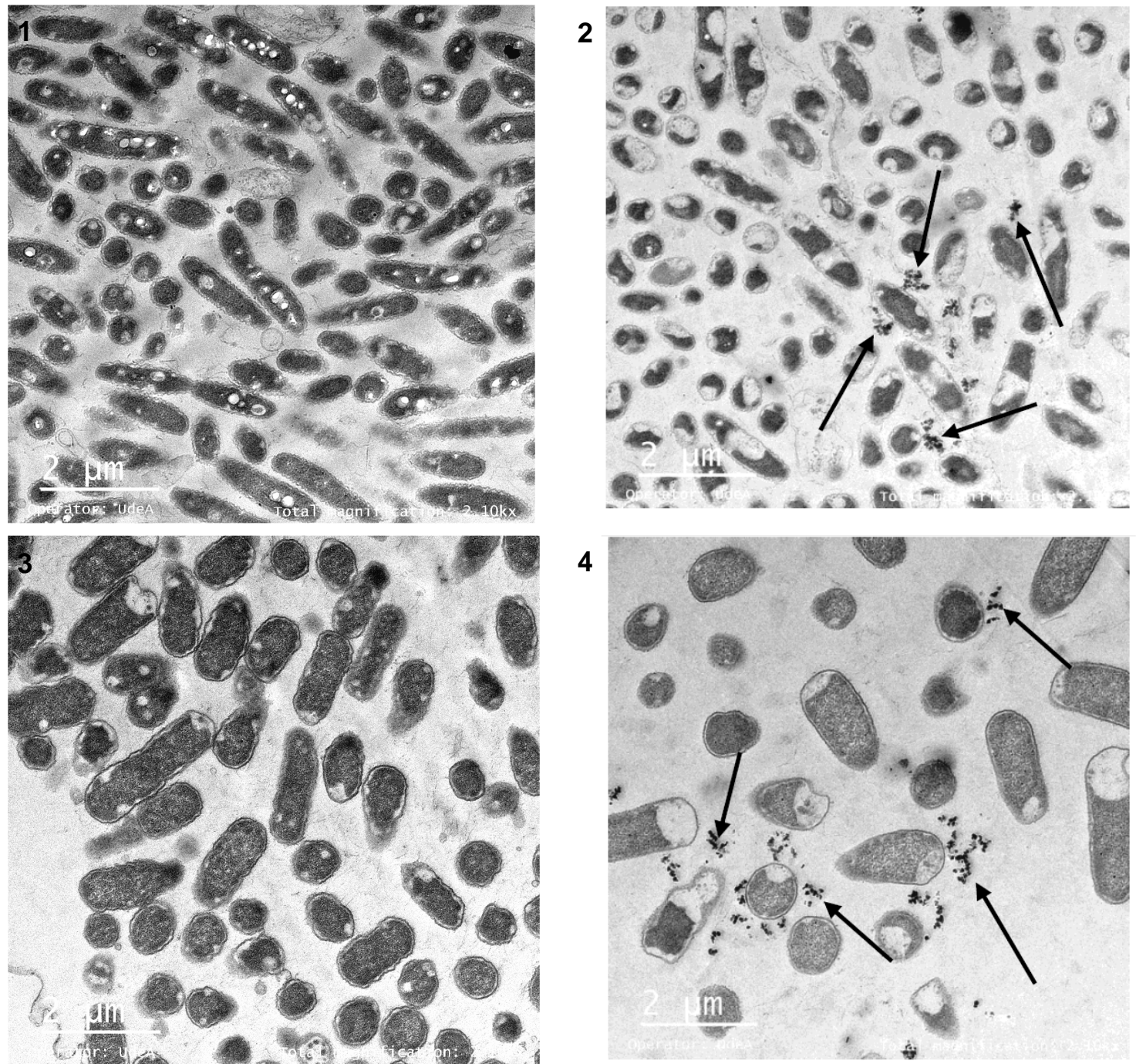


Figura 2 parte 1. Imágenes TEM de *Serratia* sp. (1–2), *Exiguobacterium* sp. (3–4); Imágenes A y C (0 mg/L Cd) y las flechas señalan gránulos de Cd en el exterior de las células expuestas a una concentración de 15 mg/L Cd.

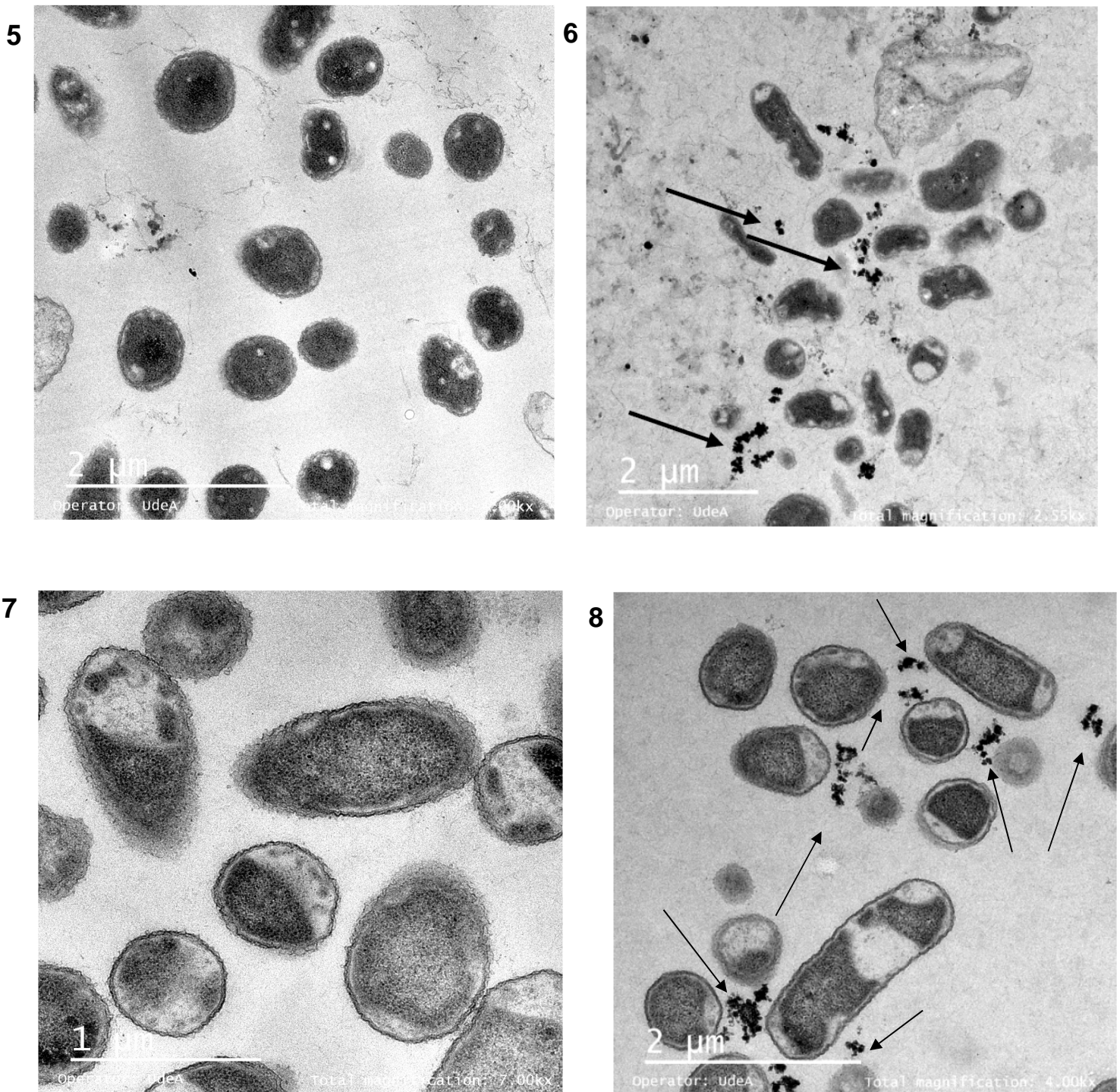


Figura 2 parte 2. Imágenes TEM de *Ralstonia* sp. (5–6), *Enterobacter* sp. (7–8); Imágenes A y C (0 mg/L Cd) y las flechas señalan gránulos de Cd en el exterior de las células expuestas a una concentración de 15 mg/L Cd.

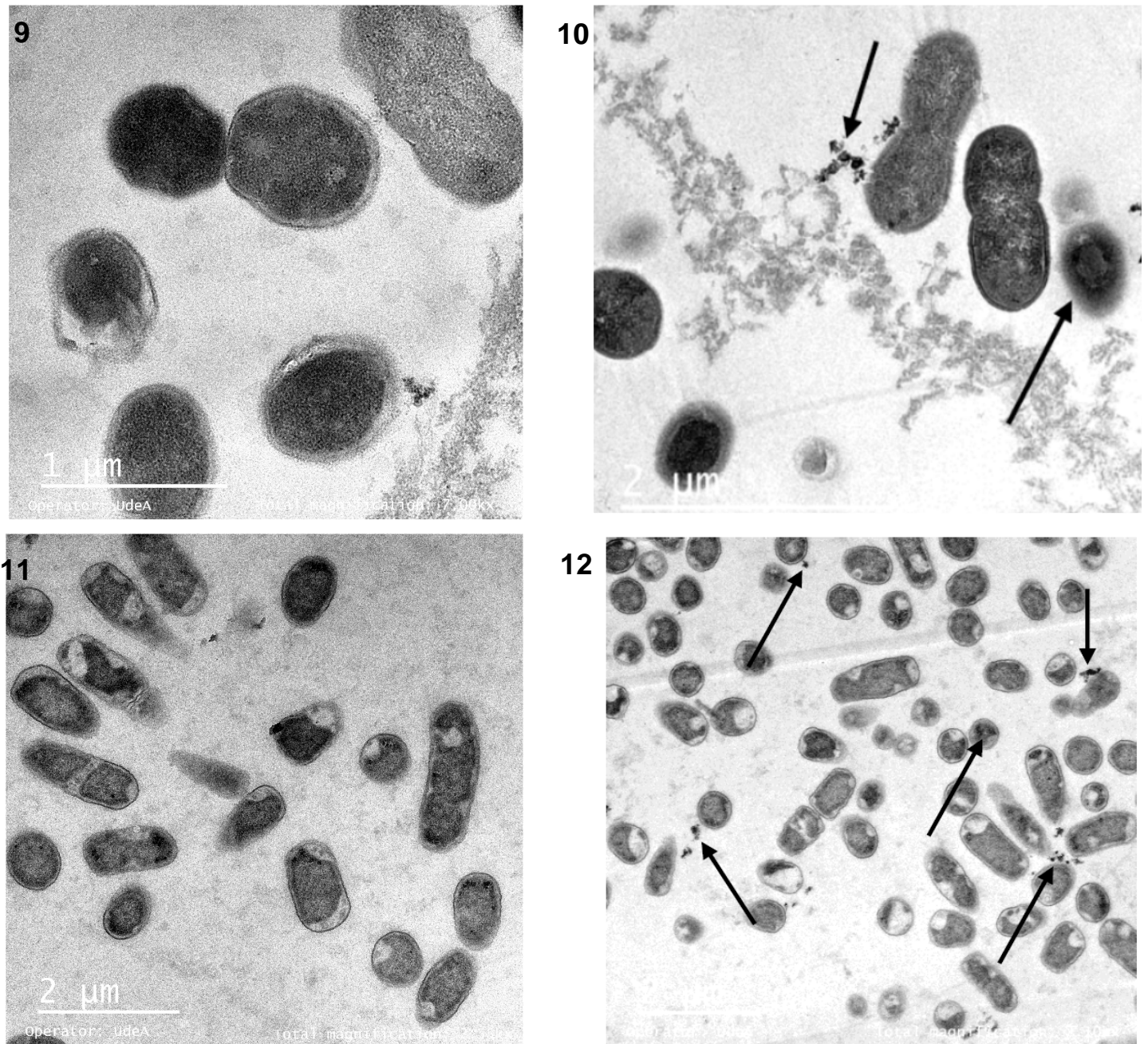


Figura 2 parte 3. Imágenes TEM de *Lactococcus* sp. (9–10) y *Bacillus* sp. (11–12); Imágenes A y C (0 mg/L Cd) y las flechas señalan gránulos de Cd en el exterior de las células expuestas a una concentración de 10 y 15 mg/L Cd respectivamente.

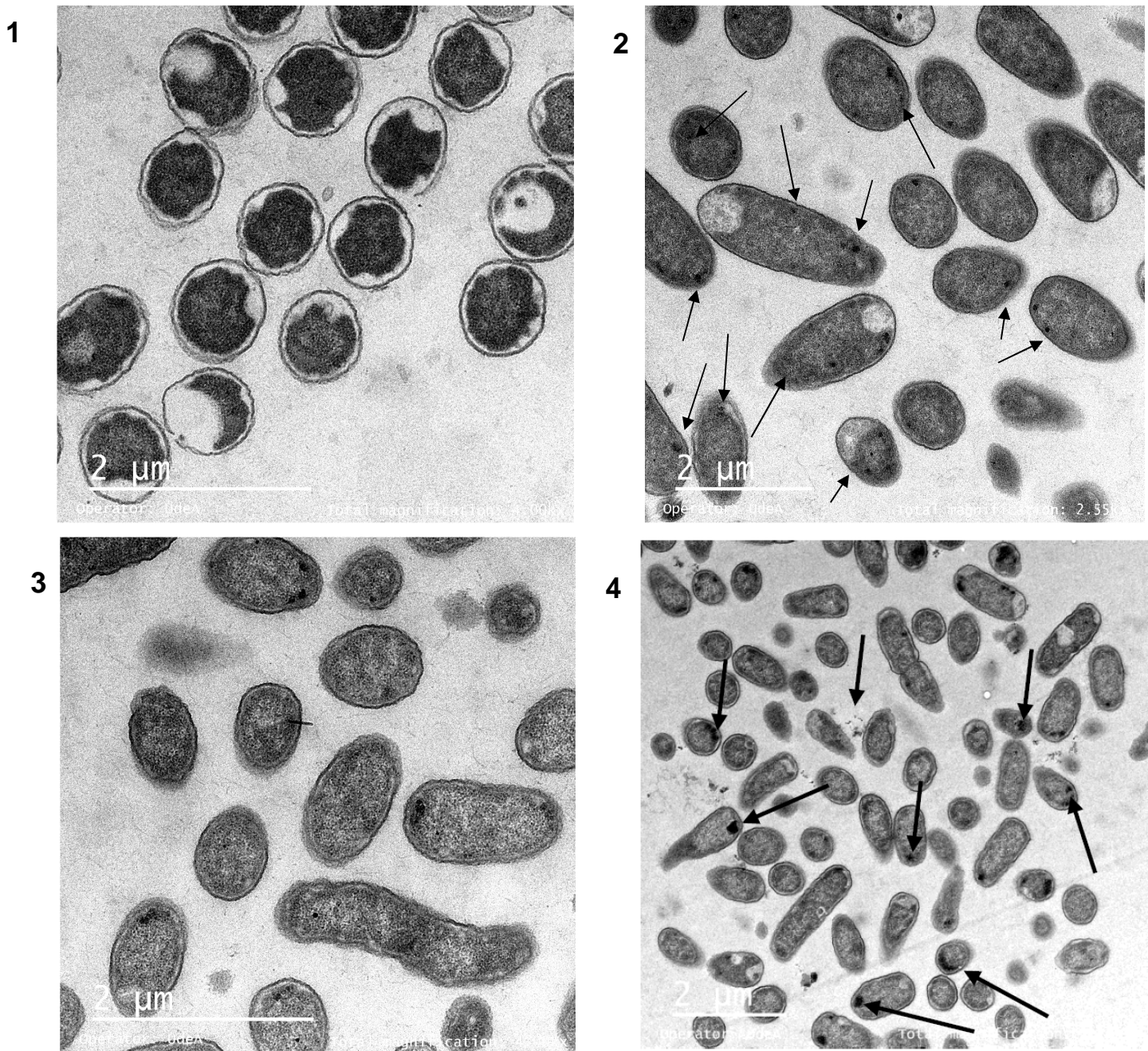


Figura 3 parte 1. Imágenes TEM de *Burkholderia* sp. (1–2), *Cupriavidus* sp. (3–4); Imágenes A y C (0 mg/L Cd) y las flechas señalan gránulos de Cd en el interior de las células expuestas a una concentración de 10 y 15 mg/L Cd respectivamente.

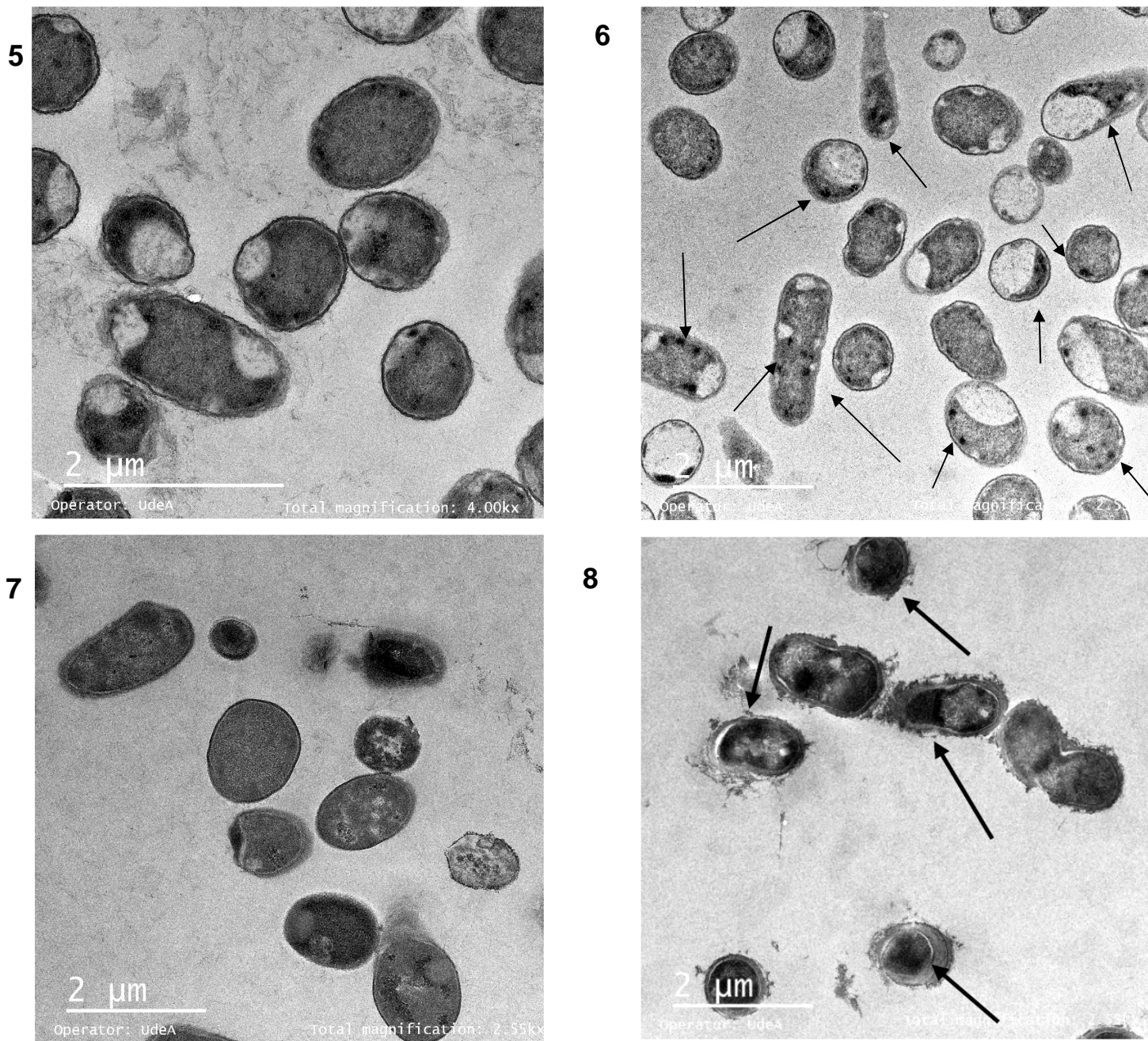


Figura 3 parte 2. Imágenes TEM de *Escherichia* sp. (5–6), *Klebsiella* sp. (7–8); Imágenes A y C (0 mg/L Cd) y las flechas señalan gránulos de Cd en el interior de las células (Citoplasma) expuestas a una concentración de 15 mg/L Cd respectivamente.

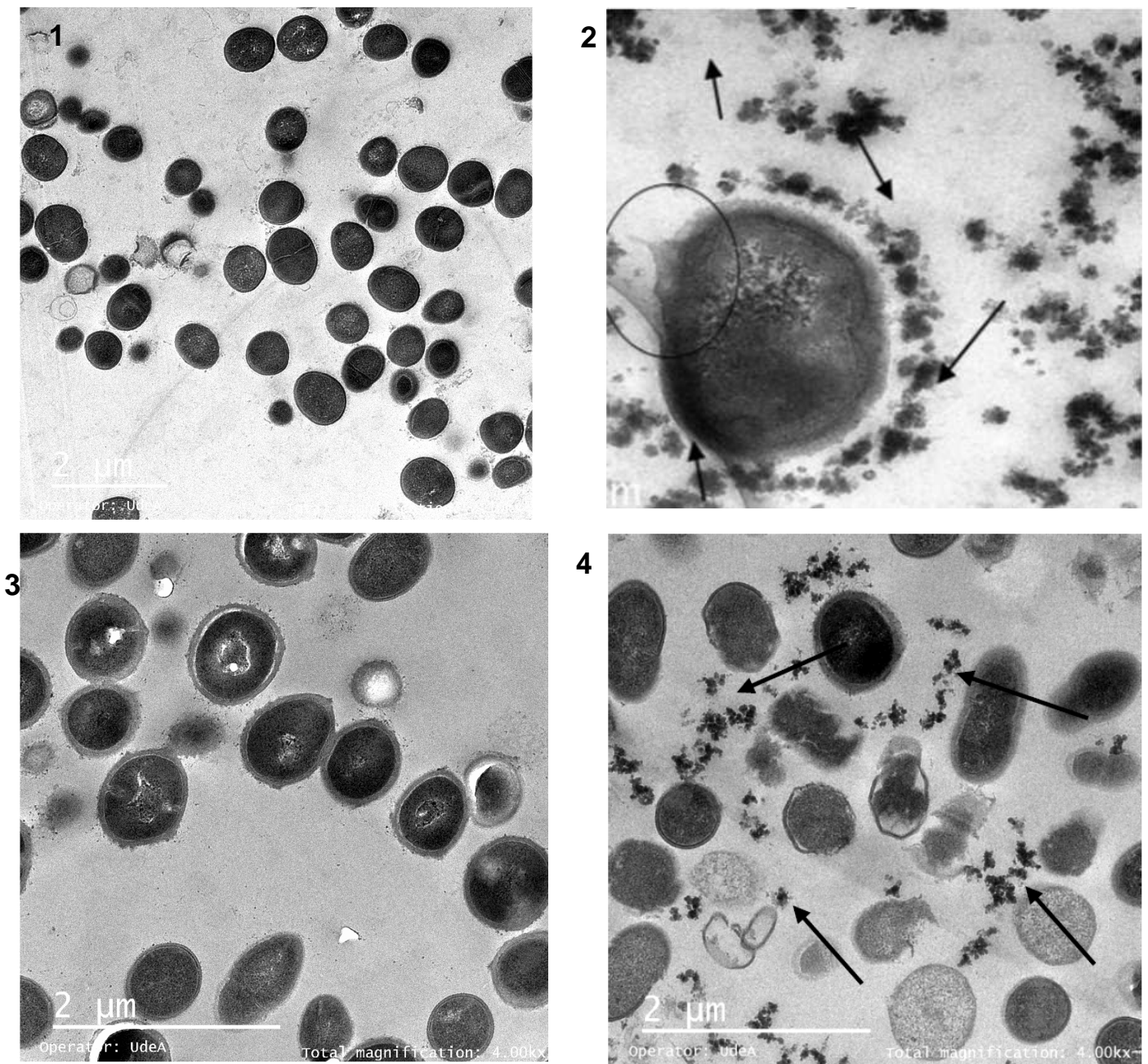


Figura 4. Bacterias nativas *Staphylococcus* sp. (1–2) y *Dermacoccus* sp. (3–4). Imágenes A y C (0 mg/L Cd), B y D (15 mg/L Cd). Círculo en B indica presencia de exopolisacárido para *Staphylococcus* sp. evitando que Cd entre en contacto con la pared celular (imagen 3); para la imagen 4, las flechas indican la presencia de los gránulos de Cd.

3.3.3. Espectros FT-IR

Análisis FT-IR del estudio reveló, antes y después de la interacción con Cd, indican que muchos de los grupos funcionales están envueltos en procesos de biosorción (Figura 6 parte 1 y 2). Los principales grupos de la pared celular de las bacterias se observó cambios alrededor de 3300 cm^{-1} $-\text{OH}$ de la glucosa y los picos entre $1100\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$ del N-H de las proteínas asignados a la vibración del enlace C-O y C-N respectivamente. Para alguna de las muestras se identificó picos entre $1637\text{--}1529\text{ cm}^{-1}$ que corresponden al enlace C=O. en la tabla 4 se muestran el cambio en el número de onda y en la tabla 5 se resume los grupos funcionales y tipo de vibración. Los resultados FT-IR mostró que los grupos funcionales están envueltos en los procesos de biosorción en *Bacillus* sp. (10-2), *Lactococcus* sp. (22-4), *Cupriavidus* sp. (15-1) and *Burkholderia* sp. (17-1).

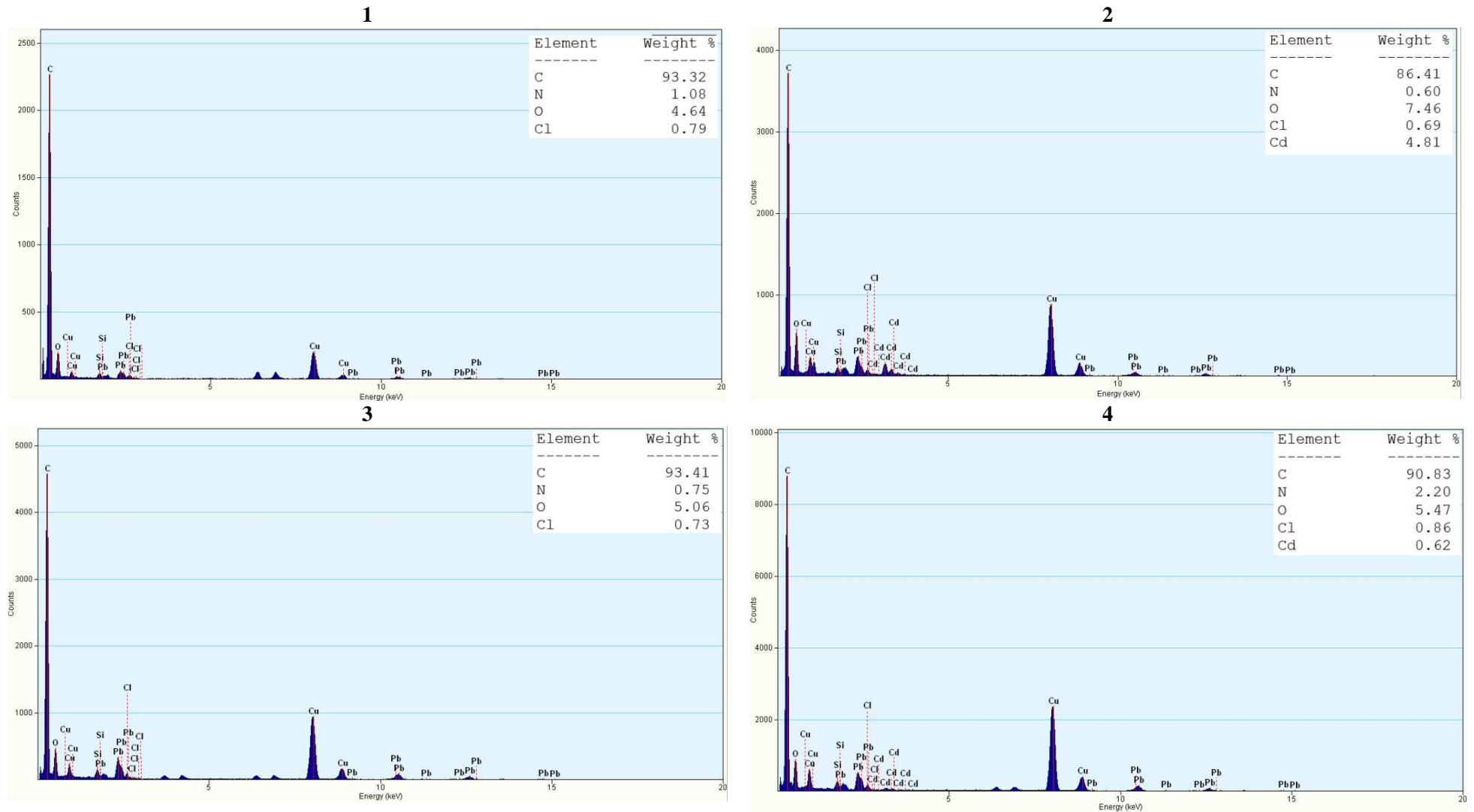


Figura 5. Espectros EDX de algunas cepas. Numero 1 y 2: *Klebsiella* sp. (18-4B); Numero 3 y 4: *Enterobacter* sp. (29-4B). 1 and 3 antes; 2 y 4 después de la absorción de Cd. Picos en 3.4 Kev en numerales 2 y 4, cambian los niveles de N y O.

Tabla 4. Cambios en el número de onda (cm^{-1}) para las bacterias nativas analizadas.

Cepa nativa	Número de onda (cm^{-1}) Sin tratamiento con Cd	Número de onda (cm^{-1}) con tratamiento de Cd
<i>Serratia</i> sp. (6-2)	2851; 1468; 1455; 1226; 1075; 1051; 911; 855	2852; 1467; 1452; 1227; 1074; 1050; 915; 859
<i>Cupriavidus</i> sp. (15-1)	3274; 2923; 2873; 1528; 1466; 1455; 1388; 1230; 1171; 969; 914; 854	3275; 2922; 2872; 1529; 1467; 1456; 1389; 1225; 1170; 968; 912; 857
<i>Klebsiella</i> sp. (18-4B)	2923; 2873; 1528; 1466; 1388; 1338; 1231; 1054	2922; 2872; 1530; 1467; 1389; 1339; 1226; 1061
<i>Bacillus</i> sp.(10-2)	2957; 2923; 2850; 1529; 1390; 1226; 1055; 966; 910; 853	2958; 2922; 2851; 1530; 1388; 1227; 1061; 965; 914; 860
<i>Ralstonia</i> sp. (16-1)	3275; 2873; 1634; 1389; 1171; 1059; 967	3277; 2872; 1636; 1388; 1170; 1061; 968
<i>Escherichia</i> sp. (4-2)	3276; 2957; 1637	3274; 2851; 1635
<i>Enterobacter</i> sp. (29-4B)	3278; 2958; 1531; 1456; 1388; 1228; 1171	3277; 2957; 1529; 1455; 1387; 1229; 1169
<i>Exiguobacterium</i> sp. (11-4A)	3274; 2959; 2873; 2852; 1637; 1230; 1058; 969	3276; 2958; 2875; 2851; 1638; 1220; 1036; 965
<i>Burkholderia</i> sp. (17-1)	3276; 2957; 2871; 2851; 1466; 1452; 1394; 1226; 1077; 1056; 966	3274; 2958; 2873; 2852; 1467; 1455; 1390; 1227; 1075; 1054; 965
<i>Lactococcus</i> sp. (22-4)	3279; 2922; 2873; 1634; 1529; 1466; 1454; 1225; 1057; 965	3276; 2923; 2874; 1637; 1526; 1468; 1452; 1219; 1054; 964
<i>Cupriavidus metallidurans</i> (R)	3275; 2922; 1635; 1537; 1468; 1394; 1339; 968; 914; 861	3277; 2923; 1636; 1530; 1467; 1389; 1338; 969; 913; 860

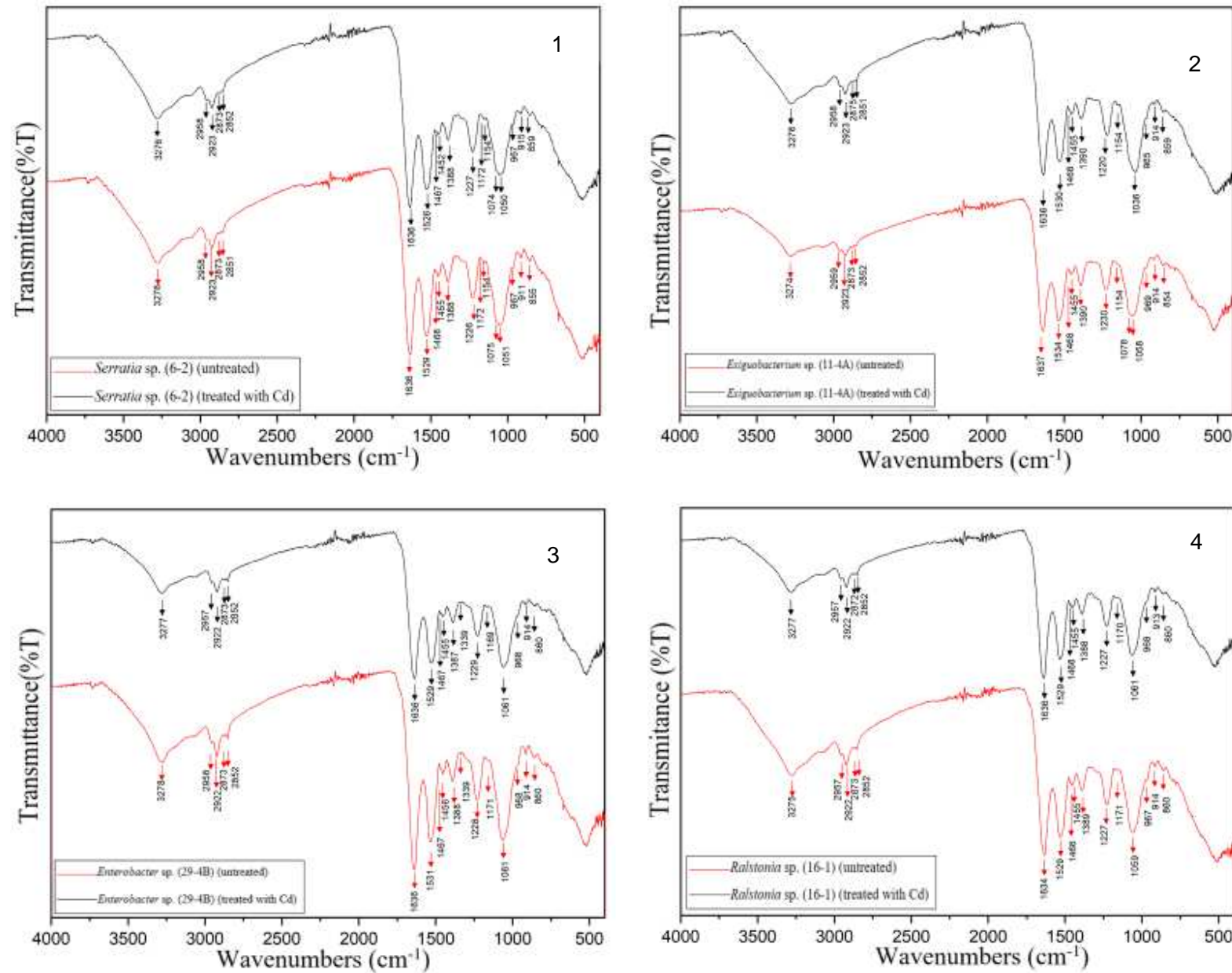


Figura 6 parte 1. Espectros FT-IR de las bacterias nativas. 1. *Serratia* sp. (6-2); 2. *Exiguobacterium* sp. (11-4A); 3. *Enterobacter* sp. (29-4B); 4. *Ralstonia* sp. (16-1). Línea roja para las células sin Cd, línea negra para las células en presencia de Cd.

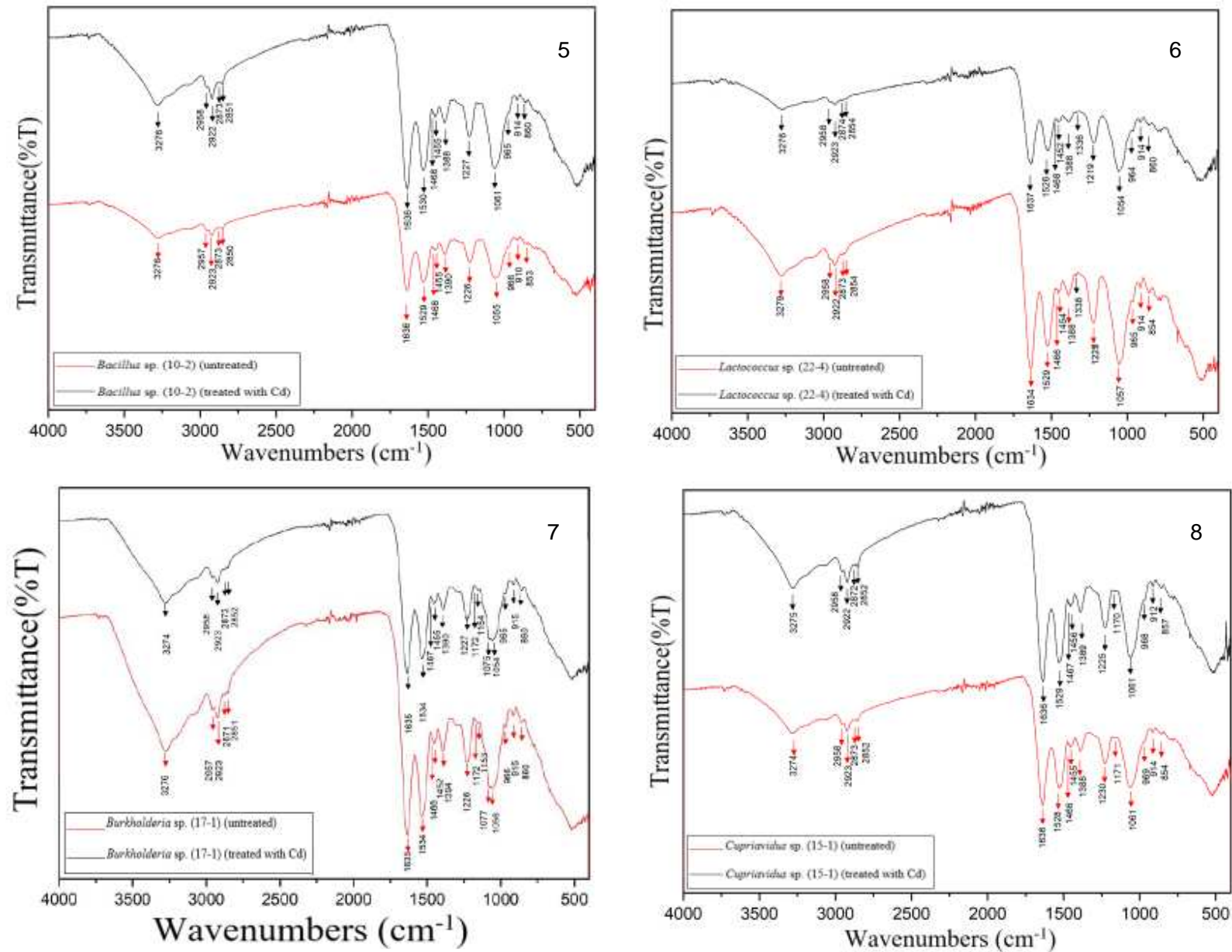


Figura 6 parte 2. Espectros FT-IR de las bacterias nativas. 5. *Bacillus* sp. (10-2); 6. *Lactococcus* sp. (22-4); 7. *Burkholderia* sp. (17-1); 8. *Cupriavidus* sp. (15-1). Línea roja células sin Cd, línea negra células con Cd.

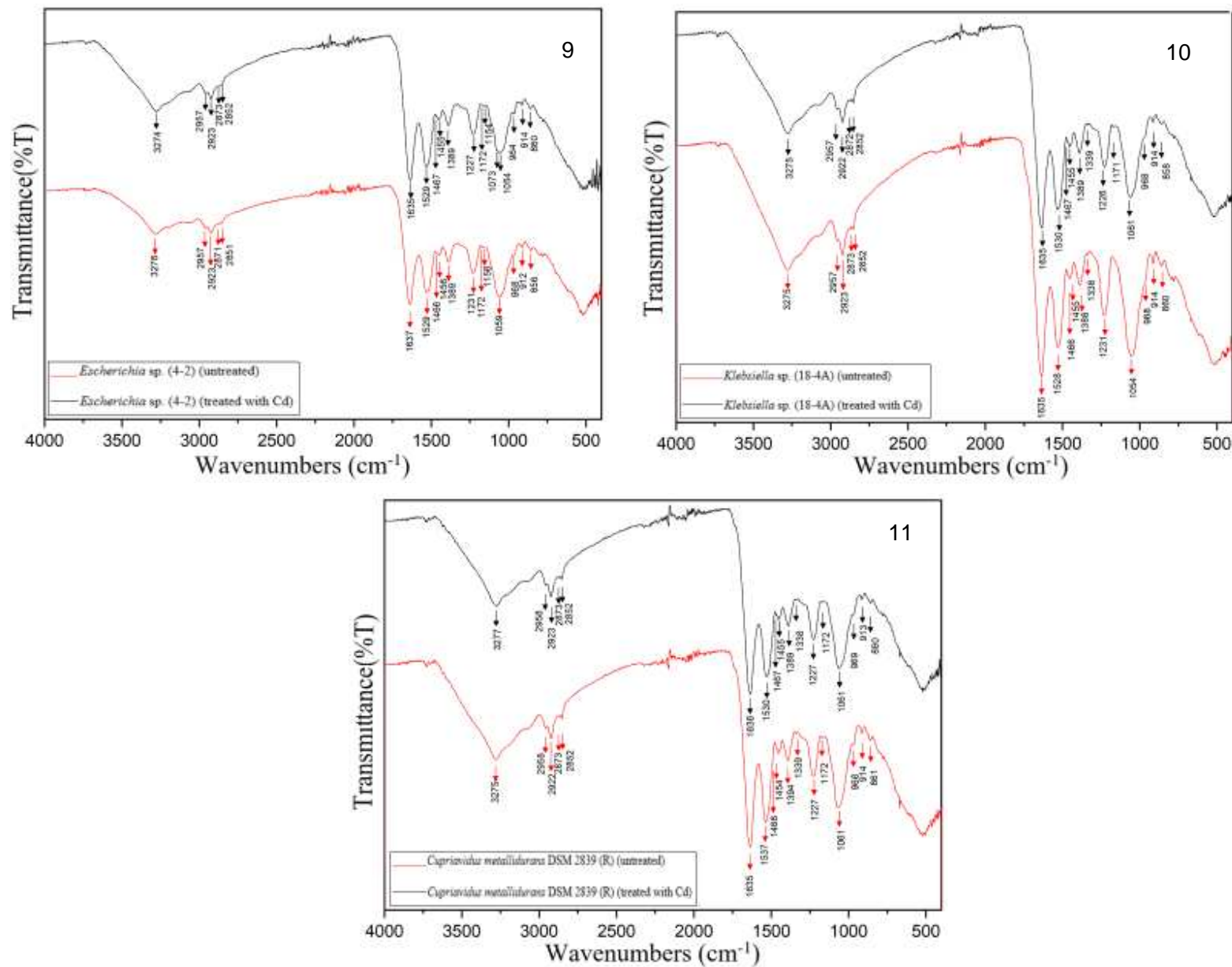


Figura 6 parte 3. Espectros FT-IR de las bacterias nativas. 9. *Escherichia sp. (4-2)*; 10. *Klebsiella sp. (18-4B)*; 11. *Cupriavidus metallidurans* DSM 2839 (R). Línea roja células sin Cd, línea negra células con Cd.

Tabla 5. Identificación de grupos funcionales de la pared celular de las bacterias nativas analizadas.

Número de onda (cm^{-1})	Asignación	Tipo de vibración
~3275	Amide A	Stretch N-H proteins
2958/2873	Methyl CH_3	Stretch C-H asymmetric lipids/carbohidrates/proteins
2923/2852	Methyl CH_2	Stretch C-H asymmetric lipids/carbohidrates/proteins
~1636	Amide I	Stretch C = O proteins
1529	Amide II	Flexion N – H proteins
1467	Methyl CH_2	Flexion C-H proteins/lipids
1455	Methyl CH_3	Flexion C-H proteins/lipids
1389	Carbonyl	Stretch C=O asymmetric fatty acids and amino acids
~1230/~1060	Phosphate PO_2^-	Stretch P=O asymmetric phospholipids, nucleic acids
~966	Phosphate PO_2^-	Stretch P=O symmetric phospholipids, nucleic acids
~914	Ketones	C – O ring vibrations of nucleic acids “sugars”
~860	C-H group	Tri-substituted bending C – H

DISCUSIÓN

En los últimos años, el aislamiento y caracterización de bacterias nativas en ambientes complejos o con presencia de contaminantes, ha tomado bastante relevancia a nivel científico. Los microorganismos pueden resistir el estrés ambiental a través de una rápida mutación y evolución (Yin et al., 2019), sumado al estudio de los mecanismos de tolerancia de bacterias nativas, los cuales pueden contribuir al desarrollo efectivo en estrategias de biorremediación (Sun et al., 2020). La presente investigación estableció el comportamiento de varias bacterias nativas en caldo nutritivo suplementado con Cd en dos niveles, 10 y 15 mg/L, que corresponden a niveles de Cd en suelos cultivados con cacao en el departamento de Santander, lo que permitió evidenciar los mecanismos de acción, cuantificar el % de captación e identificar algunas interacciones de las cadenas laterales de la pared celular de estas bacterias frente a Cd. El conocimiento de estos mecanismos como la biosorción de metales y/o bioacumulación citoplasmática de metales pesados empleando bacterias, pueden ser de gran importancia para la inmovilización de Cd, dadas las ventajas de aplicación, alta eficiencia, bajo costo y amigable con el medio ambiente (Lata et al., 2019). De acuerdo con las variables μ , g y K confirman el comportamiento de tolerancia o capacidad de las bacterias frente a Cd, incluso para algunas se calculan valores menores en presencia del contaminante, lo cual las hace tener ventaja de sobrevivencia a la presencia de un restrictor de crecimiento como son los metales pesados. En cuanto a la concentración de Cd, 10 bacterias presentaron crecimiento a niveles de Cd entre 10 y 15 mg/L y 2 bacterias (*Staphylococcus* sp. y *Dermaococcus* sp.) conservan la densidad óptica inicial durante todo el tiempo de incubación, lo cual indica que las concentraciones seleccionadas no permitieron su desarrollo, siendo consideradas como control negativo, lo que indica que la concentración de Cd es una variable de afectación para las demás curvas de crecimiento.

En cuanto a la bacteria de referencia empleada como control positivo, *Cupriavidus metallidurans* DSM 2839, se obtuvo un comportamiento similar a lo reportado en estudios previos (Zoropogui et al., 2008; Siripornadulsil and Siripornadulsil. 2013). Dependiendo del género bacteriano, existen varios mecanismos por los cuales los iones del metal se unen o interaccionan con la superficie celular como son fuerzas de Van der Waals, enlaces covalentes, interacciones redox y precipitación extracelular o la combinación de estos procesos (Rajendran et al., 2003). Otro aspecto a considerar y que de hecho es diferencial, son las características de la pared celular de las bacterias Gram negativas, dado que

contienen peptidoglicano y lipopolisacáridos, considerándose más complejas que las de bacterias Gram positivas, que contienen ácido teicoico y ácido lipoteicoico, cuyas cadenas laterales son grupos fosforilo e hidroxilo, lo cual les pueden conferir mayor o menor capacidad de biosorción (Chojnacka, K., 2010; Xie, Y., 2014).

La concentración del contaminante y su especiación influyen en la capacidad de acumulación, que junto con el pH de la solución juegan un rol clave en la biosorción de metales pesados, dado que el pH influye en la solubilidad, en el estado de ionización de los grupos funcionales sobre la superficie del biosorbente y compiten con iones que coexisten en la solución (Ozdemir et al., 2009); las bacterias nativas del estudio, luego de 24 horas de crecimiento en caldo nutritivo, contaron con capacidad de captación de Cd entre 8 al 79% e intervalo de pH final del medio entre 5.14 y 6.88. Según el TEM, la morfología celular de algunas bacterias a nivel de superficie, presentan ciertas arrugas y formas alargadas o deformes cuando están expuestas a Cd, lo que son causas del efecto tóxico del metal pesado. Lo anterior en concordancia con el aspecto físico de las colonias en medio de cultivo en placa en presencia de Cd, algunas exhiben hinchazón con textura líquida de forma irregular, otras generan costra superficial y halos o simplemente la colonia se ensancha cubriendo mayor área en la placa de cultivo.

De manera individual, para la cepa *Serratia* sp. (6-2) se encontró un porcentaje de captación bajo e interacción extracelular con Cd. De acuerdo con Chen et al., (2019) para *Serratia marcescens* HB-4 de acuerdo con la concentración de Cd del medio y el tiempo de interacción, puede presentar mecanismos sinérgicos entre sí como absorción extracelular, acumulación en periplasma y absorción intracelular. En cuanto a la cepa *Cupriavidus* sp. (15-1), se encontró un porcentaje de captación del 24% y forma de bioacumulación intracelular. Según Ferreira et al., reportó el mismo mecanismo que depende del metabolismo celular y puede ocurrir en células vivas capaces de generar energía, es un mecanismo de captación lento en comparación con mecanismos de absorción extracelular, pero con mayor capacidad. Respecto a *Klebsiella* sp. (18-4B) se obtuvo un 78% de capacidad de captación y acumulación intracelular. Se reportan estudios de *Klebsiella variicola* con capacidad de biosorción de Ni y Co superior al 50% (Afzal et al., 2017) otros autores como Shamin, S. y Rehman, A., indican la posibilidad que tiene *Klebsiella pneumoniae* de tener captación intracelular por la formación de sulfuro e incremento en la acumulación de fósforo inorgánico, ya que se forma CdS en el exterior y

mediante el sistema transportador de magnesio o manganeso al ingresar a la célula (Shamin, S. and Rehman, A., 2012; Holmes et al., 1997). Para la cepa de *Bacillus* sp. (10-2), se obtuvo un 28% de captación de Cd y un mecanismo de acumulación extracelular. Según Mathew, B., et al., *B. toyonensis* SCE1 aislada de agua subterránea, mostró actividad acumulativa extracelular con Pb, e incluso se empleó en la síntesis de nanopartículas como absorbente de este metal pesado (Mathew, B., 2018). Se reportan especies de *Bacillus* con actividad frente a Cd, en especial *Bacillus catenulatus* JB-022, *B. megaterium* NCT-2 y *B. paranthracis* NT1 con actividad acumulativa extracelular (Kim, S., et al., 2015); para *B. megaterium* se reportó mecanismo de bioacumulación intracelular con alto porcentaje de captación de Cd (43%) y para *B. paranthracis* acumulación extracelular con un 3% de captación (Chi, Y., et al., 2020). En cuanto a la cepa *Ralstonia* sp. (16-1) a las 24 horas se reportó con una captación de Cd en un 60.5% y un mecanismo bioacumulador extracelular. De acuerdo con Pugazhendhi, A., et al., la bacteria *Ralstonia solanacearum* KTSMBNL 13, la cual se aisló de suelos contaminados con metales pesados de la industria electroplateado, presenta mecanismo de biosorción con Pb, alcanzando niveles del 90% (Pugazhendhi, A., et al., 2018). En cuanto a actividad frente a Cd de *Ralstonia* sp. se referencia a *Ralstonia* sp. HM-1 el mecanismo de acción extracelular o biosorción y precipitación en sulfuro de Cd (Park, Y., et al., 2008).

Adicionalmente, la cepa *Escherichia* sp. (4-2) contó con una capacidad de captación del 53.9% y mecanismo intracelular. Según Sriram, M., et al., (2011), *Escherichia fergusonii* KLU01 cuenta con la habilidad de producir lipoproteínas biosurfactantes, que la hacen tolerante a metales pesados, incluido Cd; otro mecanismo reportado para *E. coli* es, según Valls, M., et al., (1998) la expresión de metalotioneínas unidas a la membrana y lipoproteína asociada a peptidoglicano como LamB, incluso señala que las metalotioneínas unidas a metales los movilizan a sitios específicos de la estructura celular, lo anterior está relacionado con las observaciones realizadas por TEM y porcentaje de captura de Cd para la bacteria nativa 4-2. En cuanto a la cepa *Enterobacter* sp. (29-4B) captó un 47% de manera extracelular, de acuerdo con Zhou, J., et al., *Enterobacter tabaci* aislada de semillas de arroz con presencia de Cd y caracterizada como bacteria endófito tolerante a Cd, se inoculó en macetas hidropónicas sembradas con arroz, disminuyeron la translocación de Cd a las raíces de la planta en un porcentaje superior al 70% (Zhou, J., et al., 2020). Respecto a mecanismo de captación de Cd por parte del género *Enterobacter* sp., en especial para *Enterobacter ludwigii* LY6 se ha reportado la producción de

exopolisacárido, los cuales pueden ser el mecanismo de captación de Cd (Wang, Q., et al., 2020). Referente a la cepa *Exiguobacterium* sp. 11-4A, se obtuvo un 28% de captación extracelular de Cd. De acuerdo con Park, J., la bacteria *Exiguobacterium* sp. aislada de suelo en una granja cerca de una explotación minera, presentó captación de Cd a nivel extracelular, incluso por esta acción hubo cambio en la estructura y composición de la pared celular durante el crecimiento bacteriano (Park, J. and Chon, H., 2016). En cuanto a la bacteria *Burkholderia* sp. (17-1) se encontró un porcentaje de captación de Cd del 21% y mecanismo intracelular. Según Zhang, J., et al., *Burkholderia cepacia* GYP1 presentó alta captación de Cd, la cual fue cambiante a medida que transcurre el contacto de la bacteria con el contaminante, el estudio refiere que a las 24 horas presentó acumulación de Cd extracelular e intracelular y dos días después se incrementó la concentración acumulada de Cd al exterior de las células junto con la producción de exopolisacárido (Zhang, J., et al., 2019). Por último, la bacteria *Lactococcus* sp. (22-4) bajo las condiciones del experimento, presentó un 46% de captación de Cd de forma extracelular. La investigación de Sheng, Y., et al., a partir de raíz de rábano, aisló e identificó la bacteria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, la cual presentó alta capacidad de captación a diferentes concentraciones de Cd (entre 50 a 200 mg/L) y referencia su acción extracelular o biosorción de Cd, incluso señala su acumulación en distintas partes de la membrana celular (citoderma y citomembrana) dependiendo de la concentración evaluada (Sheng, Y., 2016).

La metodología FT-IR se usó para identificar, en las bacterias nativas, los grupos funcionales con interacción con Cd. Después de 24 horas de incubación, se identificaron los grupos funcionales ubicados a nivel de la pared celular que interactúan con Cd. Por comparación entre el grupo control (sin Cd) y células tratadas con Cd, se encontró una ligera diferencia. En general para las bacterias nativas, se identificaron diferentes picos 3275 , 1634 y 1531 cm^{-1} (grupos amida), cuya absorción sugiere que el átomo de nitrógeno puede ser el sitio principal de interacción y unión de la pared celular con Cd; otro cambio se produjo en los picos 914 , 1057 , 1636 cm^{-1} , lo que indica amplificación y extensión de la banda por la presencia de grupos $\text{C}=\text{O}$; otro interesante cambio fue en los picos 2958 , 2923 , 2873 , 2852 , 1467 , 1455 y 860 cm^{-1} , esta región corresponde tanto a la extensión de $\text{C}-\text{H}$ and $\text{O}-\text{H}$, lo que sugiere la posibilidad que los átomos de oxígeno en los grupos hidroxilo sobre la biomasa celular están envueltos en procesos de absorción (Beć et al., 2020). Picos en la región 966 , 1230 , 1060 cm^{-1} indican intervención del enlace fosfato en

biosorción de Cd y puede ser indicador de la producción de fosfato de Cd sobre la superficie de la biomasa (Chakravarty R. and Banerjee, P., 2012). El escaneo EDX provee información acerca de la cuantificación de los elementos en la biomasa celular, los picos C, N y O los cuales están presentes en polisacáridos y proteínas en las paredes celulares de la biomasa bacteriana (Chakravarty R. and Banerjee, P., 2012). El Ca puede jugar un papel importante en el metabolismo celular, en especial a través del enlace con una variedad de proteínas de membrana. El Cd es un metal divalente, similar al Ca, y el Cd puede llegar a reemplazar al Ca y causar alteración de la estructura celular, observado en las imágenes TEM (Chakravarty R. and Banerjee, P., 2008). El incremento del oxígeno indica la posible existencia de óxidos que contienen Cd formados sobre la superficie de la pared celular (Huang et al., 2020).

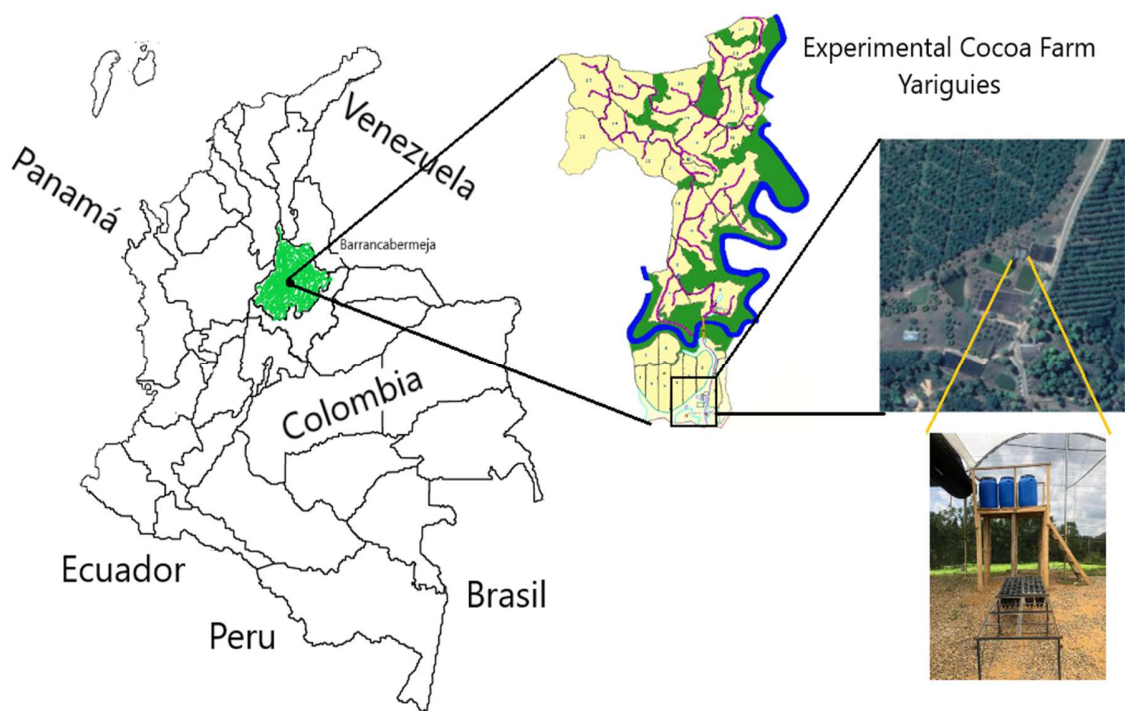
Los resultados mostraron que las bacterias nativas aisladas en suelos en presencia de Cd, cuentan con diferentes formas de interactuar con este metal pesado, bajo la metodología propuesta, se estudió la cinética de crecimiento de las bacterias, lo cual es esencial para comprender los mecanismos de adaptación a restricciones externas o nuevos ambientes, dado que generalmente se observa una relación inversa entre la tasa de crecimiento y concentraciones de metales pesados y en la mayoría de aislados tolerantes es típico que la bacteria crezca en respuesta a esta restricción externa (Oladipo, O., et al., 2018); incluso, se logró identificar el mecanismo de acción de las bacterias nativas al final de la fase exponencial de crecimiento, las cepas expuestas exhibieron cambios en su morfología, y el valor máximo de Cd evaluados, generó daño oxidativo y cambios en la permeabilidad de la membrana (Sheng, Y., et al., 2016). El uso de bacterias nativas con tolerancia asociada evidenciando mecanismos de acción como biosorción y bioacumulación citoplasmática frente a Cd, pueden ser consideradas como estrategias de mitigación en procesos de biorremediación de Cd por su bioagumentación en suelo, lo que podría reducir la translocación de Cd en granos de cacao (Bravo et al., 2021).

CONCLUSIONES

En el presente estudio, se realizó el seguimiento de 12 bacterias nativas aisladas de suelo en presencia de Cd, previamente caracterizadas molecularmente y cuyos géneros se han reportado en la literatura con propiedades de captación de Cd en formas diferentes. Las curvas de crecimiento indican que las bacterias nativas aisladas toleran altas concentraciones de Cd evaluadas y de acuerdo con los valores μ , g y K las bacterias *Lactococcus* sp. (22-4), *Klebsiella* sp. (18-4B), *Exiguobacterium* sp. (11-4A), *Cupriavidus* sp. (15-1) y *Enterobacter* sp. (29-4B) cuentan con mejores tasas de crecimiento frente a Cd. Bajo la metodología desarrollada, las bacterias nativas analizadas cuentan principalmente con dos diferentes formas de captar Cd, un mecanismo extracelular (biosorción) y el mecanismo intracelular (precipitación de Cd al interior del citoplasma) que dependen de las condiciones y tiempo de cultivo. Los resultados obtenidos por los espectros FT-IR mostraron que la superficie activa de la biomasa incluye grupos amida, carboxilo y grupos hidroxilo y fosfato, cuyos cambios son atribuidos por la complejación del Cd sobre la biomasa celular. En vista de una solución amigable con el medio ambiente e implementación práctica, la captación de Cd por parte de biomasa bacteriana puede ser una tecnología que puede proveer una solución para la remoción de Cd en distintas matrices.

Capítulo 3

**EFFECTO DE INOCULACIÓN DE BACTERIAS NATIVAS TOLERANTES A CADMIO (Cd)
SOBRE PLANTAS DE CACAO EN SUELOS CONTAMINADOS CON Cd EN VIVERO
COMERCIAL.**



RESUMEN

En los últimos años, se han empleado técnicas de inmovilización de metales pesados mediante bacterias, consideradas como alternativas económicamente viables y efectivas en remediación de suelos contaminados. El presente estudio evaluó el potencial de tres bacterias nativas *Klebsiella* sp., *Exiguobacterium* sp. y *Enterobacter* sp. previamente aisladas en suelos cultivados con cacao y en presencia de Cd. Las cepas presentaron tasas de crecimiento, porcentaje de captación y mecanismo de acción diferentes en las pruebas in vitro. Esta investigación permitió conocer el efecto de las cepas en condiciones de invernadero en tratamientos combinados empleando plantas de cacao, donde se empleó un diseño experimental de bloques completos al azar con dos factores y 3 repeticiones, por un periodo de tiempo de 4 meses. Los resultados indican que no hay diferencia significativa respecto a la presencia de las cepas bacterianas o en el incremento de biomasa de las plantas. Se observó que la concentración de Cd se distribuye de manera distinta en las diferentes partes de la planta de cacao de acuerdo con el tiempo de exposición. Los resultados sugieren que puede ocurrir cierto grado de inmovilización de Cd en suelo, impidiendo su bioconcentración en raíz, lo que puede evitar su translocación a la planta en especial cuando se bioaugmenta el suelo con *Klebsiella* sp. (18-4B).

PALABRAS CLAVES

Bacterias, suelo, cadmio, vivero comercial, cacao, CCN51.

1. INTRODUCCIÓN

El Cadmio (Cd) es uno de los metales pesados más tóxicos, el cual inhibe crecimiento de raíces y parte aérea, afecta la incorporación de nutrientes y homeóstasis y frecuentemente se acumula en cultivos importantes, siendo estos efectos incluso a bajas concentraciones (Liang, X., et al., 2014). Cultivos como el cacao se han visto afectados por los niveles de Cd, incluso la comisión europea en el año 2014 aplica desde 2019 una norma para máximas concentraciones de Cd permitidas en productos base cacao. Lo anterior ha recibido total atención llevando a cabo numerosos estudios para identificar los factores que imparten alta concentración de Cd en almendras de cacao provenientes de Latinoamérica (Engnersen et al., 2019). Cd puede ingresar al cuerpo humano a través de la cadena alimenticia, amenazando la salud, considerado un enorme reto el remediar suelos contaminados de metales pesados a nivel mundial (Zeng et al 2020). Varias técnicas tanto físicas, químicas y biológicas han sido usadas para remediar suelos contaminados con metales pesados, siendo las técnicas in situ las más recomendadas desde el punto de vista económico (Yang, Z., 2017). Muchas investigaciones han reportado el uso de enmiendas para inmovilizar Cd en suelo, incluyendo fosfatos, arcillas, materiales calcáreos, entre otras. Sin embargo, estas enmiendas a largo plazo pueden afectar condiciones del suelo, incluido el pH y las comunidades bacterianas (Woldetsadik, D., 2016). Respecto a bacterias, estudios previos muestran la capacidad de los géneros *Klebsiella* sp. (Shamin, S. and Rehman, A., 2012; Holmes et al., 1997); *Exiguobacterium* sp. (Park., J. and Chon, H., 2016) y *Enterobacter* sp. (Zhou et al., 2020) para interactuar y acomplejar Cd, siendo una posible técnica de biorremediación aplicable en suelos. En este estudio, se evaluó el efecto de 3 bacterias nativas de los géneros mencionados al ser inoculadas en suelo a diferentes niveles de Cd y sembrado con plantas de cacao en condiciones de vivero, previamente comprobada su actividad frente al metal a nivel de laboratorio, en donde exhibieron distintos mecanismos de acción como la captación de Cd a manera de biosorción e introducción de Cd al citoplasma en concentraciones que oscilaron entre 28% al 78%.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Bacterias nativas empleadas

Las bacterias nativas usadas en este estudio fueron previamente aisladas a partir de suelo no rizosférico cultivado con cacao, *Klebsiella* sp. (cepa 18-4B) (Bacteria 1), *Exiguobacterium* sp. (cepa 11-4A) (Bacteria 2), *Enterobacter* sp. (cepa 29-4B) (Bacteria 3), caracterizadas en los capítulos anteriores.

2.2. Vivero empleado

La investigación se llevó a cabo entre septiembre 2019 y abril de 2020 en la granja Yariguíes de la Compañía Nacional de Chocolates ubicada en Barrancabermeja y San Vicente de Chucurí, departamento de Santander, (6° 54' 30"N, 73° 44' 08" W), a 120 metros sobre el nivel del mar, temperatura promedio de 28°C y precipitación media anual de 2.984 mm. El presente estudio se llevó a cabo en el vivero cubierto con el que cuenta la granja, de 160 m², bajo el montaje señalado en la Figura 1.



Figura 1. Instalaciones y montaje empleado en granja Yariguies (Fuente: autor).

2.3. Diseño experimental

Se empleó un diseño experimental de bloques completos al azar con dos factores: Nivel de Cd total en suelo (bajo y alto) y tres bacterias nativas (B1-*Klebsiella* sp. 18-4B, B2-*Exiguobacterium* sp. 11-4A, B3-*Enterobacter* sp.29-4B). Para cada uno de los bloques, se realizó 3 repeticiones espaciadas por un periodo de tiempo de dos meses y en cada repetición la unidad experimental o réplica (planta) fue sembrada por duplicado para ser cosechada luego de dos y cuatro meses respectivamente. En la figura dos se resume el diseño experimental empleado.

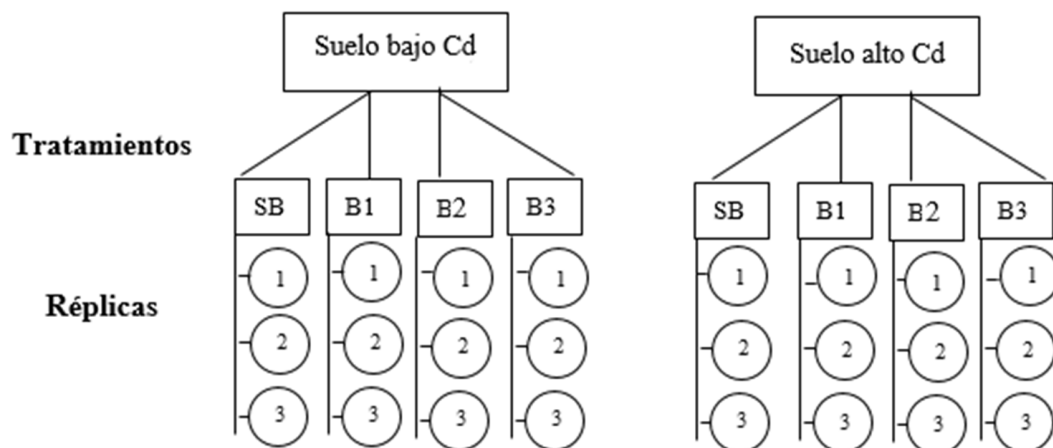


Figura 2. Diseño experimental. Consiste de cuatro tratamientos (Sin Bacteria (SB), Bacteria 1 (B1-*Klebsiella* sp. 18-4B), Bacteria 2 (B2-*Exiguobacterium* sp. 11-4A), Bacteria 3 (B3-*Enterobacter* sp. 29-4B) con tres repeticiones.

2.4. Experimentos en tubete

Se empleó semilla de cacao de la variedad CCN51, cosechada de árboles entre 7 a 8 años de edad, fitosanitariamente sanos pertenecientes a un lote sembrado solamente con esta variedad autopolinizable de la granja Yariguies (Pereira de Araujo, et al., 2017). Luego de la recolección de las mazorcas, se desinfectaron con hipoclorito de sodio (100 mg/L), se extrajo las almendras cubiertas con mucílago, el cual fue retirado para evitar pudrición de semilla (Kongor, J., et al., 2016); posteriormente las almendras se sumergieron en agua desionizada estéril y dejadas dos días para verificar la viabilidad de la semilla y logre mayor probabilidad de germinar en el tubete; una vez seleccionada, se muestreó para efectos de análisis de Cd total. El suelo empleado se extrajo del mismo lote, secado al sol y tamizado por malla # 20 para quitar piedras y raíces de plantas, luego fue sometido a esterilización con vapor húmedo para destruir insectos, larvas y patógenos presentes. Como fuente de Cd se empleó Cloruro de Cd grado analítico (Meyer®), con el cual se preparó una solución estándar de 1000 mg/L de Cd elemental para aplicarla a una parte de suelo mediante atomizador manual, agitando vigorosamente para homogeneizar y obtener concentración de Cd en suelo entre 10 a 15 mg/Kg. En la siembra, se emplearon tubetes de altura 15 cm y ancho de 8 cm con capacidad entre 800 a 900 gramos de suelo. La aplicación de cada una de las bacterias se realizó de la misma forma (spray), inoculando a una concentración de 10^8 células/gramo de suelo. Cada suelo independientemente del tratamiento realizado, se dejó en reposo por una semana en un lugar oscuro, seco y fresco (Wang, T., et al., 2014). Se sembró las semillas luego de colocar el suelo de acuerdo con el tratamiento y aleatorizadas en el montaje dispuesto. Cada tubete fue regado con agua potable de manera controlada todos los días, una vez germinadas las semillas se implementó un plan de fumigación, control y monitoreo de acuerdo con las prácticas habituales de vivero comercial. Respecto a los insumos empleados para fumigación y fertilización, se realizaron mediciones en el contenido de Cd. Respecto a los lixiviados, se recolectaron para cada uno de los tubetes y recopilados según el tratamiento y analizada su concentración de Cd total. Cada réplica fue cosechada de acuerdo con los tiempos estipulados (tiempo 1 de 60 y tiempo 2 de 120 días) para las 3 repeticiones.



Figura 3. Estado inicial del montaje (Fuente: autor).



Figura 4. Plantas de cacao de los diferentes tratamientos aleatorizadas en tubetes antes de ser cosechadas (Fuente: autor).

2.5. Muestreo y análisis

Luego de cosechadas, las plantas se limpiaron y a cada una se les separó su raíz, tallo y parte aérea y se registró el peso fresco. A cada una de las partes se realizó peso seco mediante el secado de las muestras en un horno a 80°C hasta peso constante. Tanto a los suelos como al material vegetal se les realizó análisis de Cd mediante digestión en una solución de $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ en proporción 1:6. La concentración de Cd en los extractos fue medida por ICP-OES y se calculó los factores de bioconcentración (FBC) y translocación (FT) (Padmavathiamma, P., and Loretta, L., 2007).

2.6. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados para cada tiempo de recolección, realizando una ANOVA y comparación de medias se realizó prueba de Tukey usando R studio.

3. RESULTADOS

3.1. Análisis de suelo y niveles de Cd de los insumos empleados en el estudio

Se empleó suelo (pH 4.88, Conductividad eléctrica 0.27dS/m, materia orgánica 1.53%, nitrógeno total 0.074%, fósforo 11.6 mg/g, arcilla 2%, arena 88%, limo 10%) recolectado en la granja donde se realizó el ensayo, clasificado como suelo franco arenoso de acuerdo con método Bouyoucos. Una vez se procesó el suelo de acuerdo con los tratamientos, se verificó concentración de Cd la cual, para las muestras control (bajo Cd) fue en promedio de 0.332 mg/Kg y para las muestras con adición de solución de Cd (alto Cd) fue de 12.95 mg/Kg. En cuanto al análisis de Cd a la semilla de cacao empleada en los distintos tratamientos el resultado promedio fue de 0.14 mg/Kg. De la misma forma se verificó la presencia de Cd en el agua potable, cuyo reporte indicó no detectable. Respecto a los agroquímicos empleados en el estudio Ridomil Gold N60WP (fungicida de Syngenta®) su nivel de Cd total fue de 2.67 mg/Kg; para Basacote 12M (fertilizante NPK de Compo Expert®) fue de 0.534 mg/Kg. En cuanto a Nilo 350SC (insecticida de ADAMA®), Bélico® 500SC (Fungicida), Imidogen® 350SC (insecticida), Nutremin® 200EC (insecticida), Carrier (coadvudante-encapsulador de Colinagro®) no se detectó presencia de Cd total.

3.2. Biomasa de raíz y parte aérea de las plantas de cacao

La acumulación de biomasa en cada una de las partes de las plantas de cacao para cada uno de los tiempos se resume en la tabla 1 y figura 5. El análisis ANOVA indica que, para raíz y parte aérea, los factores influyentes para la fluctuación de la biomasa son tiempo y concentración de Cd presente. Las pruebas pareadas de Tukey indican que, para los niveles de biomasa obtenidos, no hay diferencia significativa entre muestras control (sin bacteria) y muestras con presencia de bacterias. Se observa que para el tiempo 2 hay una disminución en la ganancia de biomasa en raíz y parte aérea cuando está presente Cd.

Tabla 1. Efecto de la inoculación de las bacterias sobre la biomasa para los tratamientos

Nivel Cd	Tratamiento	Peso fresco (g)						Peso Seco (g)					
		Raíz		Tallo		Parte aérea		Raíz		Tallo		Parte aérea	
		T1 ^a	T2 ^b	T1 ^a	T2 ^b	T1 ^a	T2 ^b	T1 ^a	T2 ^b	T1 ^a	T2 ^b	T1 ^a	T2 ^b
Bajo	Control	5.55±1.91	6.58±2.10	7.4±4.2	8.0±1.2	8.3±1.8	10.5±0.2	0.74±0.47	1.17±0.15	1.37±0.55	2.31±0.29	1.89±0.58	3.52±0.49
	Bacteria 1	3.56±0.09	6.13±2.56	4.6±0.1	8.5±2.7	6.9±0.9	12.0±4.9	0.42±0.06	1.14±0.13	1.29±0.63	2.29±0.54	1.57±0.82	3.49±1.52
	Bacteria 2	3.39±0.08	5.70±1.73	5.4±0.9	8.4±0.8	7.7±0.5	12.7±1.9	0.58±0.19	1.13±0.23	1.58±0.47	2.18±0.27	1.85±0.74	3.95±0.96
	Bacteria 3	3.43±0.52	7.34±2.49	5.1±1.5	9.5±2.1	7.7±0.6	14.0±2.3	0.44±0.11	1.35±0.10	1.31±0.43	2.50±0.88	1.78±0.60	4.17±0.84
Alto	Control	3.83±1.22	4.81±2.03	4.9±1.7	8.6±1.1	6.6±0.5	10.4±0.5	0.44±0.05	1.01±0.36	1.19±0.34	2.47±0.29	1.57±0.65	3.25±0.51
	Bacteria 1	2.53±1.17	3.97±0.70	4.2±0.8	7.0±1.3	5.4±0.7	9.5±1.8	0.40±0.02	0.86±0.18	1.14±0.41	2.04±0.29	1.33±0.78	3.25±0.58
	Bacteria 2	3.18±0.49	4.28±2.36	5.0±0.5	6.2±2.8	5.9±1.0	8.3±3.6	0.48±0.26	0.87±0.14	1.05±0.25	1.81±0.52	1.58±0.95	2.81±1.07
	Bacteria 3	3.13±1.36	3.42±1.28	4.2±1.9	6.1±0.5	5.2±1.4	7.8±1.9	0.50±0.07	0.79±0.41	1.04±0.30	1.92±0.58	1.22±0.76	2.77±0.87
ANOVA (Tipo II)													
	Tratamiento	8.82	1.91	6.46	5.81	1.53		0.09		0.22		0.16	
	Tiempo	12.56	64.09	18.31	18.77	10.91		2.81***		10.7***		38.81***	
	Nivel Cd	3.10	32.25*	19.59	21.14	59.92*		0.51**		0.90		3.75*	
	Tratamiento : Cd	1.66	5.55	4.68	0.85	29.35		0.02		0.38		1.09	

T1 y T2, se refiere a los tiempos en los cuales se cosecharon las plantas de cacao; T1: Dos meses; T2: Cuatro meses. Los valores son la media ± desviación estándar. Letras diferentes son estadísticamente diferentes a p<0.05 (prueba pareada Tukey). Nivel de significancia: ***p<0.001; **p<0.01; *p<0.05

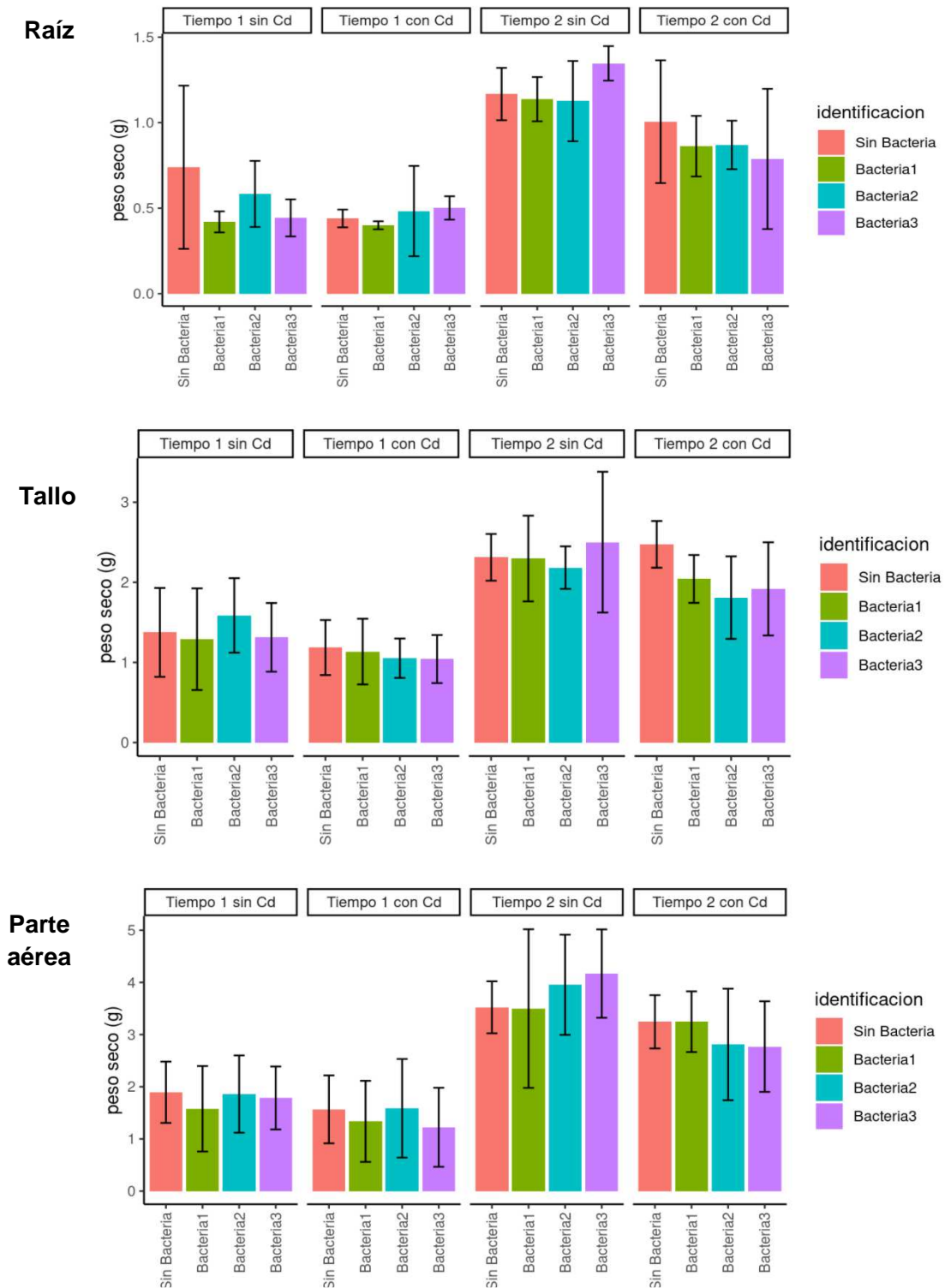


Figura 5. Comparación del Peso seco para cada parte de la planta; Bacteria 1 (B1-*Klebsiella* sp.), Bacteria 2 (B2-*Exiguobacterium* sp.), Bacteria 3 (B3-*Enterobacter* sp.)

3.3. Acumulación de Cd en plantas de cacao, factor de bioconcentración y translocación

Los efectos de *Klebsiella* sp. (Bacteria 1), *Exiguobacterium* sp. (Bacteria 2), *Enterobacter* sp. (Bacteria 3) sobre la acumulación de Cd en raíz, tallo y parte aérea para cada uno de los tiempos se resume en la tabla 2 y figura 6. De acuerdo con el análisis ANOVA, no hay diferencia significativa respecto a la acumulación de Cd para cada uno de los tratamientos, en el mismo sentido, las pruebas pareadas de Tukey indican que para cada tiempo no hay diferencia significativa entre las muestras control y con presencia de bacterias; sin embargo, se evidencia una reducción de Cd acumulado en raíz para tiempo 1 (60 días) en *Klebsiella* sp., la cual fue del 23.38% y para tiempo 2 (120 días) fue del 25.12%, en presencia de alta concentración de Cd en suelo. Respecto al tallo, se observa que se reduce su bioacumulación en tiempo 1 para *Klebsiella* sp., la cual fue del 19.34% y *Enterobacter* sp. en 10.93% para el tiempo 2. Los resultados de los efectos de las bacterias sobre el factor de bioconcentración de Cd en raíz expuesto a los dos niveles de Cd total en suelo muestran que no hay diferencia significativa para los tiempos de estudio y cuyo factor en general indica que las plantas de cacao son acumuladoras de Cd. De lo anterior se puede destacar que la bioconcentración obtenida por *Klebsiella* sp. frente a bajo y alto Cd (T1: 1.51 y T2: 2.27 respectivamente) es menor en comparación con los tratamientos control. En cuanto al factor de translocación, a nivel general indica que la planta de cacao cuenta con capacidad fitoextractora de Cd y esta eficiencia aumenta de acuerdo con la concentración de Cd presente en suelo.

Tabla 2. Concentración de Cd y factores para los tratamientos de estudio.

Tiempo	Tratamiento	Cadmio total (mg/Kg) por partes de la planta						Factores			
		Raíz		Tallo		Parte aérea		Bioconcentración (FBC)		Translocación (FT)	
		Bajo	Alto	Bajo	Alto	Bajo	Alto	Bajo	Alto	Bajo	Alto
T1	Control	1.88±0.85	21.89±4.12	1.30±0.95	60.54±14.81	1.94±0.40	39.16±28.91	4.92±4.17	2.54±0.07	1.13±1.54	4.30±2.54
Mes 2	Bacteria 1	0.84±0.19	16.98±2.01	1.11±0.41	68.22±26.61	1.34±0.33	40.45±34.63	3.12±0.70	1.51±0.07	0.76±0.68	8.24±6.61
	Bacteria 2	0.56±0.26	21.15±2.89	2.21±1.52	64.51±25.01	1.18±0.41	45.06±31.23	2.75±1.91	2.39±1.06	0.24±0.17	5.18±3.03
	Bacteria 3	0.94±0.57	25.48±8.24	0.89±0.06	66.15±5.10	1.18±0.57	40.49±25.91	3.56±1.64	2.51±1.36	0.95±1.20	3.77±1.31
T2	Control	1.25±0.39	26.49±8.80	2.17±2.02	56.79±24.39	1.24±0.45	55.36±11.75	4.60±1.49	3.36±0.90	5.82±10.83	7.69±10.47
Mes 4	Bacteria 1	0.72±0.26	19.96±6.34	1.59±0.58	45.96±6.87	0.67±0.24	66.09±17.46	2.28±0.59	2.27±0.56	5.32±7.80	7.76±9.47
	Bacteria 2	1.26±0.87	27.39±18.44	1.79±1.25	63.45±17.66	1.53±0.22	64.82±28.36	4.64±3.19	2.53±0.28	5.82±10.83	6.39±6.70
	Bacteria 3	0.84±0.96	25.71±11.96	0.94±0.52	50.67±10.44	1.07±0.45	64.45±6.44	3.53±3.99	2.48±0.77	6.64±11.87	4.37±1.62
ANOVA (tipo II)											
	Tratamiento	0.64	150.92	3.21	224.10	1.20	197.50	0.03	0.11	69.76	25.22
	Tiempo	0.09	59.20	0.41	543.0	0.49	2745.80	0.02	0.02		
	Tratamiento : Cd	0.53	23.67	1.23	357.50	1.14	81.3	0.08	0.01		

Los valores son la media ± desviación estándar.

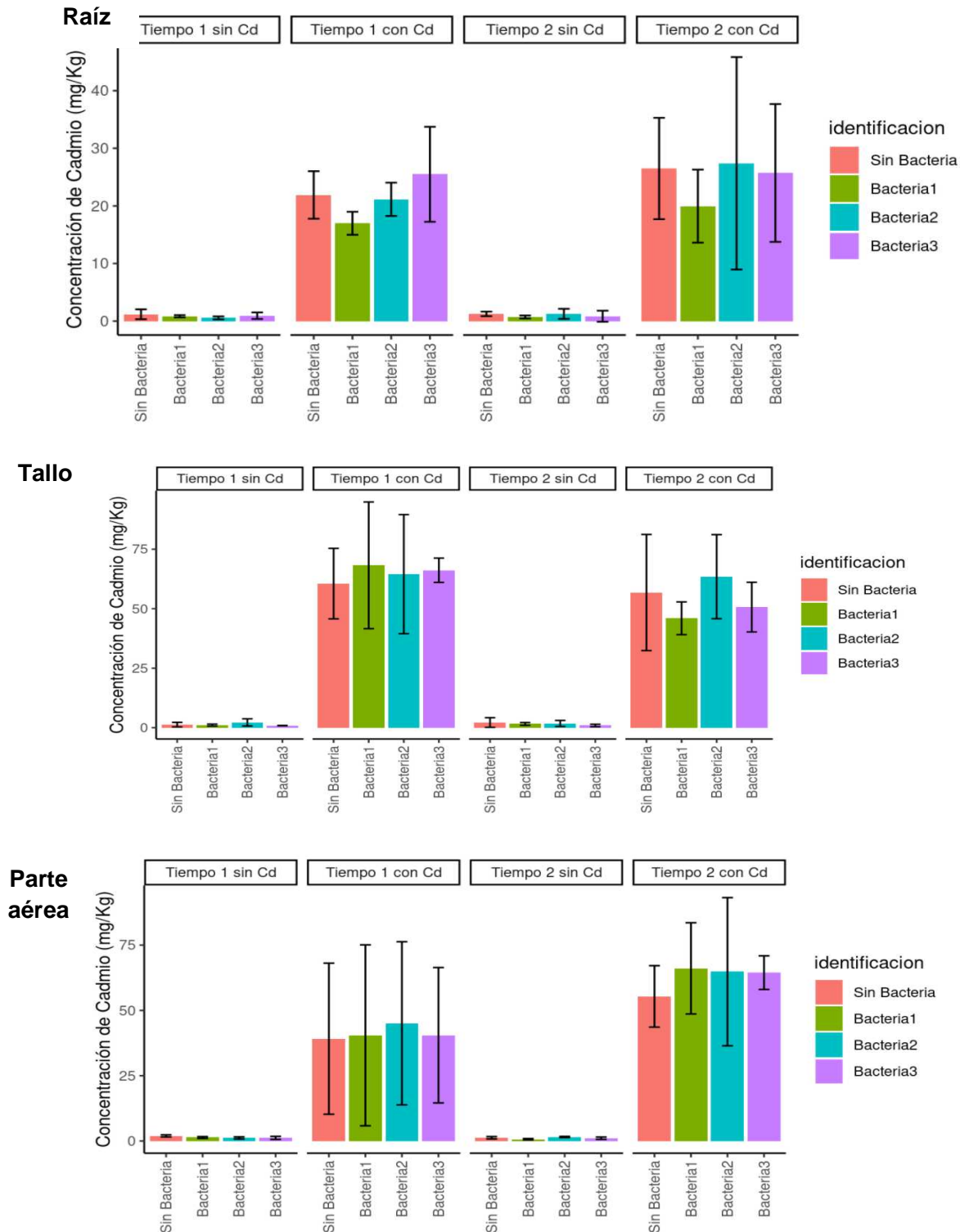


Figura 6. Acumulación de Cd para cada parte de la planta de cacao. Bacteria 1 (B1-*Klebsiella* sp.), Bacteria 2 ((B2-*Exiguobacterium* sp.), Bacteria 3 (B3-*Enterobacter* sp.).

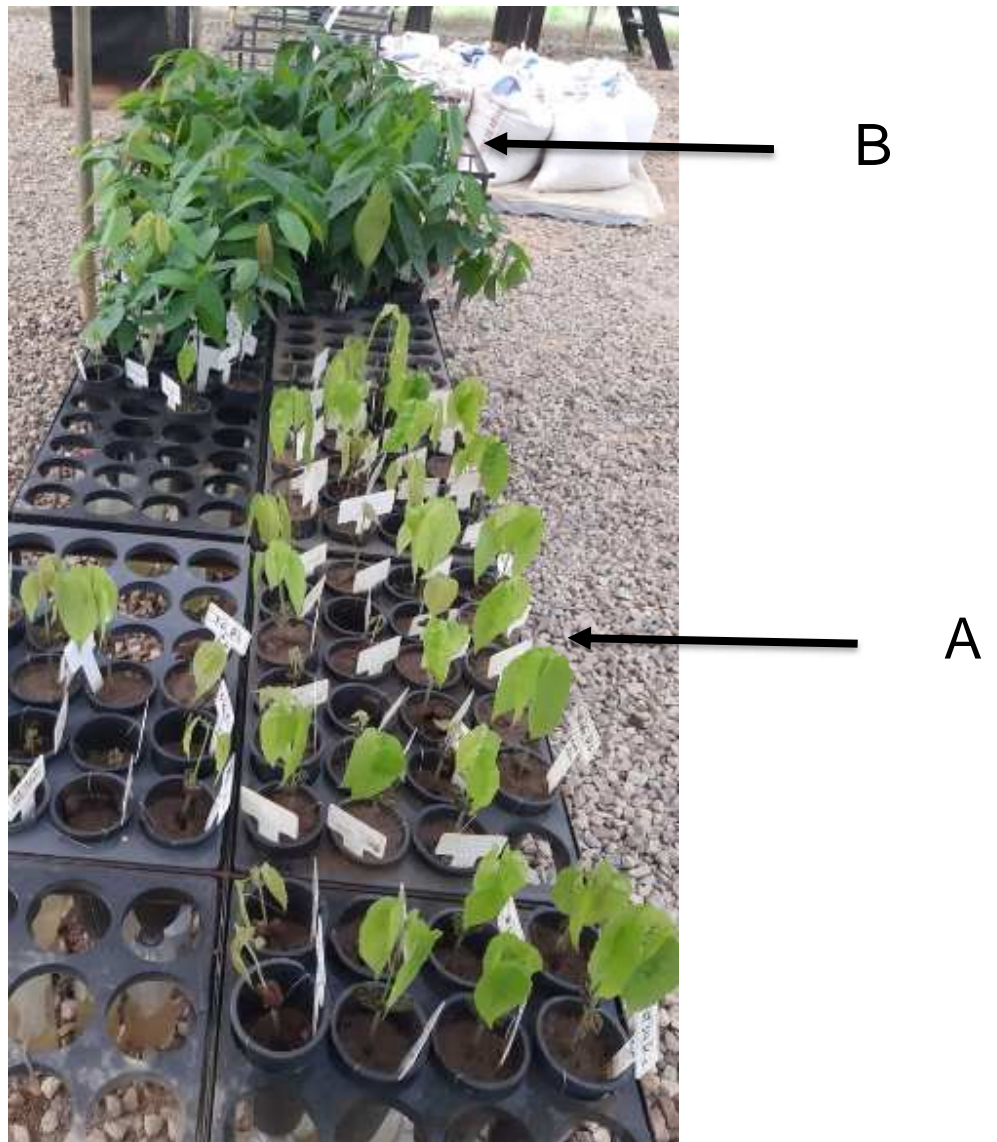


Figura 7. Estado fisiológico de las plantas de cacao en los distintos tiempos del experimento A) 2 meses; B) 4 meses. (Fuente: autor)



Figura 8. Diferencias fisiológicas entre plantas sin Cd (A) y con Cd (B). A) planta con alta producción de biomasa aérea, tallo largo y grueso, con presencia de varios peciolo; raíz principal larga y recta, raíces secundarias abundantes. B) Planta con biomasa aerea baja, tallo corto y delgado, los peciolo cubren la parte superior del tallo, presencia de raíz principal larga, delgada, curva y frágil, y pocas raíces secundarias (Fuente: autor).

DISCUSIÓN

Se efectuó seguimiento de plantas de cacao bajo diferentes tratamientos y tiempos, con el propósito de evaluar el comportamiento de 3 bacterias nativas, que previamente a nivel de laboratorio se había demostrado su mecanismo frente a Cd. Se realizó un biosensayo bajo condiciones controladas de vivero comercial y se evaluó la capacidad de captación de Cd de las plantas de cacao en presencia de las cepas bacterianas. Se utilizó la variedad autocompatible de cacao CCN51, dada su mayor presencia en los cultivos de Sudamérica, alta resistencia a enfermedades, perfil aromático y mayor contenido de polifenoles y manteca de cacao en grano (Boza et al., 2014). Hay varios factores que influyen directamente en la toxicidad de Cd en cacao, como son concentración, tiempo de exposición, textura y características químicas del suelo como pH, materia orgánica, entre otras (He et al., 2015). Respecto al suelo empleado cuenta con textura franco arenosa, el cual tiene ciertas ventajas como fácil de labrar, baja compactación, absorción rápida de agua y cuentan con buen drenaje, pero dadas estas condiciones requiere riego y fertilización permanente, dadas las pérdidas de nutrientes por lixiviación. Este suelo tiene pH ácido, el cual es un factor importante para procesos de absorción de Cd. De acuerdo con Qi et al., 2018, señala la posibilidad de interacción del Cd con óxidos de hierro, manganeso y carbonatos, que por lo general están inmóviles, permitiendo la libre movilidad, fito-disponibilidad e intercambio de Cd. Respecto a la materia orgánica, el suelo cuenta con bajo porcentaje, lo cual para el experimento tiene cierta ventaja, dado que según Shahid et al. (2016), la biodisponibilidad de Cd está directamente influenciada por el humus, sustancia dentro de la materia orgánica responsable de mantener nivel alto de pH y contenido de ácido fulvico altamente reactivo, promoviendo la biodisponibilidad de Cd.

En cuanto a la fuente de Cd, se empleó una de las más estables como lo es Cloruro de Cd, altamente móvil en suelo y soluble en agua (Sauve, et al., 2000) buscando elevar la concentración presente en el suelo y comparar los efectos que provoca el metal en las plantas en presencia de las bacterias inoculadas.

Según Zug, et al., (2019), el uso de fertilizantes contaminados o no con Cd, pueden causar altos niveles de Cd en cultivos, contaminarlos directamente o generar mayor movilidad de Cd en suelos ácidos, para la planta en sí mismo obtener un crecimiento más rápido o mayor absorción de Cd por las micelas del suelo (Zug, K., et al., 2019). En nuestro caso, se usaron

agroquímicos para fertilizar el suelo con NPK y lograr la germinación de semilla, también el de controlar posibles plagas u hongos que llegasen a afectar a las plantas. Dichos agroquímicos como fungicidas e insecticidas, los cuales se adicionaron de manera rotacional según lo establecido por la granja, cuentan con baja concentración de Cd y cuya dosis aplicada contribuyó a incrementar la concentración de Cd total alrededor de 0,01mg/Kg para cada uno de los tratamientos, sin determinar otro grado de influencia en el experimento. Ciertos microorganismos desarrollan resistencia potencial a Cd, dominando las condiciones rizosféricas y promoviendo el crecimiento de las plantas bajo estrés de Cd, contando con mecanismos inherentes para unir Cd libre a nivel de pared celular, acomplejamiento a nivel de citoplasma o con la excreción de ácidos orgánicos quelantes de Cd (Liu, H., et al., 2020).

Las bacterias nativas empleadas en el experimento fueron aisladas y caracterizadas a nivel de laboratorio, caso *Klebsiella* sp. (MN587897) (Bacteria 1), género perteneciente al filo Proteobacteria, es un bacilo Gram negativo, la cual mostró tolerancia a Cd presente en caldo nutritivo en concentraciones entre 10 a 15 mg/Kg; según Pramanik et al., (2018), la inoculación de *Klebsiella* sp. como bacteria promotora de crecimiento de plantas y bioacumuladora de Cd, decrece significativamente la concentración de Cd en los tejidos de plantas de maíz, confiriendo a la planta cierta tolerancia a Cd. Por su parte *Exiguobacterium* sp. (MN587893) (Bacteria 2), es un bacilo Gram positivo perteneciente al filo Firmicutes, tolerante a Cd en concentraciones entre 5 a 10 mg/Kg; Jan et al., (2019) reportó la capacidad de biorremediación de *Exiguobacterium* sp. en plantas de arroz, por su capacidad intracelular de acumulación, sumado a su carácter de promotor de crecimiento de plantas por ser una bacteria endófito; en cuanto a *Enterobacter* sp. (MN587891) (Bacteria 3), pertenece al filo Proteobacteria, es un bacilo Gram negativo, tolerante a Cd en solución presente en caldo nutritivo a concentración entre 10 a 15 mg/Kg; Sabir et al., (2020) reportó la inoculación de *Enterobacter* sp. MN17 en *Brassica*, cuyo efecto es la mejora en el crecimiento de las plantas, a su vez de reducir la disponibilidad de Cd por su acomplejación mediante proteínas de membrana o por su acumulación intracelular.

Estos géneros bacterianos fueron empleados en el experimento por contar con condiciones importantes como crecimiento rápido y alta producción de biomasa celular a

las 24 horas sin requerir medios de cultivos complejos y tolerar altas concentraciones de Cd.

En cuanto a biomasa representada en peso seco para raíz y parte aérea se observó un incremento para todos los tratamientos con mayor diferencial en tiempo 2 sin la presencia de Cd; la biomasa obtenida por la bacteria 3 es levemente mayor para raíz y parte aérea frente al control, las cuales, sin contar con diferencias estadísticamente significativas, pueden estar relacionada con la presencia de la bacteria (Figura 7).

De acuerdo con el análisis de varianza, hay diferencia significativa ($p < 0.05$) para la biomasa en raíz y parte aérea respecto al tiempo de exposición y concentración a Cd. Físicamente se evidenció que estas plantas contaron con una raíz larga y delgada con baja producción de raíces secundarias, en cuanto a la altura se refleja ligera reducción y baja producción de parte aérea en los tratamientos con alta concentración de Cd, con el consecuente decrecimiento de peso seco para todas las partes de la planta (Figura 8). Esta pérdida en rendimiento puede darse por la toxicidad originada por la alta concentración de Cd disponible en suelo (Ehsan, M., et al., 2009). Los resultados mostraron que Cd fue absorbido por el sistema radicular y acumulado en todos los órganos de la planta de cacao, demostrando una alta tasa de translocación. La acumulación en las partes de la planta cambió en el tiempo, dado que para los primeros 60 días se presentó mayor concentración en Tallo>Parte aérea>Raíz y luego de 120 días cambia a Parte aérea>Tallo>Raíz. Según Verbruggen, N., et al., (2009) una mayor acumulación de metales en la raíz es característico de plantas intolerantes, mientras que plantas con la habilidad de translocar metales hacia la parte aérea es reconocido como factor de tolerancia (Verbruggen, N., et al., 2009).

Lo anterior está relacionado con los Factores de bioconcentración (FBC) y translocación (FT) indican que la relación entre la concentración Cd en raíz y suelo (FBC) y la relación entre concentración de Cd en tallo y raíz (FT); $FBC < 1$ y $FT < 1$ la planta es excluyente, si el $FBC > 1$ y $FT > 1$ la planta es acumuladora y $FBC > 10$ es hiperacumuladora (Padmavathiamma, K., 2007); en nuestro estudio, se encontró que para todos los tratamientos con alta concentración de Cd en tiempo 1 el FBC fue de 2,23 y FT de 5.37 y para tiempo 2 el FBC fue de 2,66 y FT de 6.55, confirmando que las plantas de cacao del estudio son acumuladoras y fito-extractoras de Cd. De acuerdo con Li et al., (2018) cuya investigación de inmovilización de Cd en plantas de soya en presencia de 100 mg/Kg de

Cd en suelo inoculadas con *Rhizobium pusence* KG2, reportó un FT de 7.5, siendo un valor menor frente a plantas sin presencia de la bacteria Gram negativa (FT 12.7), siendo el factor que contribuye a la disminución de la biodisponibilidad del contaminante por parte de la soya, cuya característica es de ser hiperacumuladora de metales pesados.

En cuanto a la concentración de Cd final en suelos y lixiviados para los tratamientos con baja concentración de Cd para el tiempo 1 se encontró un valor promedio en suelo de 0.254 mg/Kg y para lixiviados de 0.005 mg/Kg; para suelo con alto Cd de 12.94 mg/Kg y lixiviados de 0.63 mg/Kg; para el tiempo 2, el suelo de baja concentración de Cd se reporta un valor promedio de 0.22 mg/Kg y lixiviados de 0.045 mg/Kg; para suelo con alto Cd de 9.78 mg/Kg y lixiviados de 1.17 mg/Kg; valores que al contrastarse con las concentraciones iniciales dan lugar a que la fuente de Cd que translocó a las plantas provino exclusivamente del suelo con bajas pérdidas de Cd en el montaje realizado. De acuerdo a lo anterior, es interesante diseñar estrategias de biorremediación encaminadas a contrarrestar la translocación de Cd, impidiendo que la raíz tenga acción con Cd. En nuestro estudio se observó que, independiente del tiempo de exposición a Cd de *Klebsiella* sp, se obtuvo una reducción en la bioacumulación del metal en la raíz de la planta de cacao en los tratamientos con alta concentración de Cd en suelo; de la misma forma, esta bacteria obtuvo un factor de bioconcentración menor frente al control, lo que puede dar a lugar a considerarla como una alternativa para diseñar ensayos de biocontrol de Cd en suelo.

CONCLUSIONES

Actualmente la contaminación ambiental y en especial la presencia de metales pesados en suelo destinado a cultivos, es uno de los retos más importantes a solucionar en años venideros, más aún cuando distintas publicaciones refieren que la concentración de Cd en suelos de Colombia cultivados con cacao es uno de los limitantes para la industria del chocolate, la cual está en pleno auge por la calidad de grano colombiano. El uso de microorganismos o bacterias como inóculos con el objetivo de mejorar la productividad de plantas y como biocontrol es una de las opciones más reconocidas y estudiadas. En la investigación, se realizó la inoculación de 3 distintos géneros bacterianos nativos *Klebsiella* sp. 18-4B (MN587897), *Exiguobacterium* sp. 11-4A (MN587893) y *Enterobacter* sp. 29-4B (MN587891), los cuales, cuentan con mecanismos de acción frente a Cd y en especial *Klebsiella* sp., la cual presenta cierta tendencia a contrarrestar la bioacumulación de Cd en raíz de las plantas, lo que puede dar pie a realizar nuevos experimentos que permitan

confirmar estos hallazgos preliminares, buscando la reducción de los efectos adversos de Cd sobre crecimiento y productividad en cultivos de cacao en suelos con alta concentración del metal.

Conclusiones y recomendaciones generales

1.1 Conclusiones generales

Se describió las comunidades bacterianas presentes en los suelos cacaoteros de San Vicente de Chucurí con distintos niveles de Cd luego del procesamiento bioinformático de secuencias del gen ARN ribosomal 16S. Todo indica que están formadas por filos que generalmente habitan en suelo sin presencia de contaminantes, solo que las muestras procesadas presentaron variabilidad influenciada indirectamente por la concentración de Cd así como por algunas propiedades de suelo, destacando la abundancia relativa del filo Proteobacteria, similar a resultados previamente publicados; por otra parte, se identificó a las principales familias de bacterias que pertenecen a la comunidad central y que pueden participar en procesos de interés biológico en suelos. Al efectuar recuentos de viables totales en agares comerciales, se obtuvieron bajas UFC/g por la presencia del metal pesado. Mediante técnicas de microbiología convencional, se logró aislar bacterias nativas de suelo tolerantes a Cd, que luego de su caracterización molecular, pertenecen a varios géneros bacterianos que, de acuerdo con referencias, cuentan con capacidad de acción contra Cd, lo que abre la posibilidad de emplearlos en procesos de biorremediación.

Se caracterizó a nivel de laboratorio, la capacidad biorremediadora de Cd de 12 bacterias nativas, a la vez se evaluó las fases de crecimiento en ausencia y con presencia de Cd, alcanzando la fase lag entre las 24 y 36 horas luego de inoculadas en caldo nutritivo, lo cual las hace de interés en aplicaciones biotecnológicas. Respecto a su capacidad de acción frente a Cd, se encontró que en 9 de ellas cuentan con una captación de Cd mayor al 20%, reportando su mecanismo de acción como biosorción extracelular para 5 bacterias e introducción de Cd al citoplasma en 4 bacterias nativas. En la mayoría de las bacterias se presenta deformación física, lo que es normal ante la presencia de un metal pesado y su alta concentración. La metodología propuesta logró identificar la captación de

Cd por parte de las bacterias en la fase exponencial de crecimiento (24 horas) sin modificación relevante en el pH del medio. Las bacterias nativas aisladas objeto del estudio han sido referenciadas su capacidad de captación de Cd u otros metales con similar valencia, reportando mecanismos de acción como biosorción y precipitación intracelular de Cd a nivel de citoplasma.

Se validó, en condiciones de vivero, la capacidad biorremediadora de Cd de tres bacterias nativas aisladas de suelos con presencia de Cd. Se observó los efectos notorios que Cd hace a las plantas que repercute en la pérdida de biomasa y rendimiento del cultivo; es posible que las bacterias eleven la biomasa de las plantas, en especial de raíces y parte aérea en presencia de *Enterobacter* sp., también se reportó la forma de bioacumulación de Cd en los tejidos de la planta, los cuales cambian con el tiempo de desarrollo de la planta. Los resultados indican que la bacteria nativa *Klebsiella* sp. contó con el menor factor de bioacumulación de Cd en raíz y tallo, reduciendo en alrededor del 23% la translocación de Cd del suelo a raíz de plantas de cacao, lo que puede llegar a ser una de las alternativas que puede ayudar a reducir la captura de Cd por parte de las raíces de la planta de cacao.

En la actualidad, existen pocos estudios como el realizado, en los cuales, desde la selección de fincas, el diseño del muestreo, recolección y tratamiento de muestras de suelo, así como su procesamiento en búsqueda de bacterias nativas con acción frente a Cd, las cuales, una vez aisladas, se lograron identificar mediante técnicas moleculares y luego se verificó a nivel de laboratorio, su crecimiento frente a Cd y su posible mecanismo de acción, que posteriormente para algunos géneros bacterianos nativos, se realizó un bioensayo a nivel de vivero y se comprobó su capacidad de biorremediación de Cd en plantas de cacao, hacen de esta investigación de carácter integral y a su vez, bajo la metodología descrita, se generó nuevo conocimiento en ciencia básica, y aún más sobresaliente fue el de demostrar que las bacterias, las cuales son uno de los pilares de las reacciones biológicas de la naturaleza, son alternativas de innovación, desarrollo y fuente de creación de bionegocios, con las cuales es posible la solución de muchos de los problemas causados por el hombre.

1.2 Recomendaciones generales

- Estudio de los mecanismos de los microorganismos para la tolerancia a metales y su relación con el suelo y la planta, puede demostrar su acción sobre el contaminante. Los tratamientos con plantas pueden causar cambios significativos en la estructura de la comunidad bacteriana con respecto al tratamiento sin planta y se podría evidenciar un cambio con respecto al suelo inicial, como se pudo evidenciar a través del análisis de Beta-diversidad en suelos con la planta y permitiendo correlacionarse con cambios determinados en diferentes variables del sistema a través del tiempo entre cada parámetro fisicoquímico y la abundancia relativa de cada género bacteriano.
- Efectuar un monitoreo de los suelos en las fincas cacaoteras participantes en la investigación, tomando muestras en diferentes tiempos, efectuando estudios microbiológicos, con la finalidad de medir la dinámica en las comunidades bacterianas en presencia de Cd.
- Realizar un estudio a mayor escala para los demás departamentos cacaoteros del país, con el fin de conocer la calidad de estos suelos, verificar los niveles de Cd y realizar análisis metagenómico a una mayor profundidad de secuenciación, buscando obtener resultados significativos estadísticamente y visualizar la composición de las comunidades bacterianas hasta nivel de especie o sub-especie, y su interacción en suelos cultivados con cacao.
- Efectuar análisis genómicos, con el fin de conocer genes específicos e identificar rutas metabólicas, con las cuales se logre regular y potenciar la capacidad de captación de metales pesados por parte de este tipo de bacterias.
- Realización de estudios a nivel de vivero, empleando las bacterias nativas con capacidad de captación de Cd, para evaluar su accionar bajo distintas concentraciones de Cd, empleando distintos tipos de enmiendas, fertilizantes y agroquímicos naturales como control de plagas.
- Ensayos a nivel de vivero de distintas variedades de cacao criollo, bajo la misma metodología desarrollada en este estudio y encontrar que variedad es la que cuenta con menor capacidad de translocar Cd a la planta y se pueda sembrar en terrenos con concentración de Cd en suelo variable y con el seguimiento en la dinámica de los microorganismos.

REFERENCIAS

1. Afzal, A., Rasool, M., Wassen, M. 2017. Assesment of heavy metal tolerance and biosorptive potencial of *Klebsiella variicola* isolated from industrial effluents. *AMB Express*, 7, 184. <https://doi-org.ezproxy.unal.edu.co/10.1186/s13568-017-0482-2>.
2. Aiking, H., Kok, H., Heerikhuizen, H., Riet, J. 1982. Adaptation to cadmium by *Klebsiella aerogenes* growing in continuous culture procedes mainly via formation of Cadmium sulfide. *Appl. Environ. Microbiol.* 44,938–944.
3. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Oxford University Press*, 25(17), 3389–3402.
4. An, M., Chang, D., Hong, D., Fan, H., Wang, K. 2021. Metabolic regulation in soil microbial succession and niche differentiation by the polymer amendment under cadmium stress. *Journal of Hazardous Materials.* 416. 126094. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126094>.
5. Aprill, A., McNally, S., Parsons, R., & Weber, L. (2015). Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 75(2), 129–137. <https://doi.org/10.3354/ame01753>.
6. Arévalo-Gardini, E., Arévalo-Hernández, C., Baligar, V., He, Z. 2017. Heavy metal accumulation in leaves and beans of cacao (*Theobroma cacao* L.) in major cacao growing regions in Peru. *Science of the Total Environment.* 605-606. 792 – 800. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.122> 0048-9697.
7. Argüello, D., Chavez, E., Laurysen, F., Vanderschueren, R., Smolders, E., Montalvo, D., 2019. Soil properties and agronomic factors affecting cadmium concentrations in cacao beans: a nationwide survey in Ecuador. *Sci. Total Environ.* 649, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.292>.

8. Atlas, M., Bartha, R. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Cuarta edición. Addison Wesley. New York, USA. 217 – 262.
9. Becerra-Castro C, Kidd PS, Prieto-Fernandez A, Weyens N, Acea MJ, Vangronsveld J. 2011. Endophytic and rhizoplane bacteria associated with *Cytisus striatus* growing on hexachlorocyclohexane-contaminated soil: isolation and characterization. Plant and Soil. 340:413-433. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0613-x>.
10. Bhattacharya, A., Naik, S., Khare, S., 2018. Harnessing the bio-mineralization ability of urease producing *Serratia marcescens* and *Enterobacter cloacae* EMB19 for remediation of heavy metal cadmium (II). Journal of Environmental Management. 215. 143-152. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.03.055>.
11. Bissett, A., Brown, M. V., Siciliano, S. D., Thrall, P. H., 2013. Microbial community responses to anthropogenically induced environmental change: towards a systems approach. Ecology Letters. 16,128. doi: <https://doi.org/10.1111/ele.12109>.
12. Bolívar, H., Contreras, M., Teherán, L. 2016. *Burkholderia tropica* una bacteria con gran potencial para su uso en agricultura. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 19(2):102-108, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2016.06.003>.
13. Böhmer, M.; Ozdín, D.; Račko, M.; Lichvár, M.; Budiš, J.; Szemes, T. 2020. Identification of Bacterial and Fungal Communities in the Roots of Orchids and Surrounding Soil in Heavy Metal Contaminated Area of Mining Heaps. Applied Science. 10. 7367. <https://doi.org/10.3390/app10207367>
14. Bravo, D., Pardo-Díaz, S., Benavides-Erazo, J., Rengifo-Estrada, G., Brassiant, O., Leon-Moreno, C. 2018. Cadmium and Cadmium-tolerant soil bacteria in cacao crops from northeastern Colombia. J Appl Microbiol. 2018 May; 124(5):1175-1194. doi: <https://doi.org/10.1111/jam.13698>. Epub 2018 Feb 26.

15. Bravo, D., Leon-Moreno, C., Martinez, C., Varon-Ramirez, V., Araujo-Carrillo, G., Vargas, R., Quiroga-Mateus, R., Zamora, A., Gutierrez, E. 2021. The First National Survey of Cadmium in Cacao Farm Soil in Colombia. *Agronomy*. 11. 761. doi: <https://doi.org/10.3390/agronomy11040761>.
16. Burges, A., Epelde, L., Garbisu, C. 2015. Impact of repeated single-metal and multi-metal pollution events on soil quality. *Chemosphere*. 120,8–15. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.05.037>.
17. Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13. 7. 581–583.
18. Cao, X., Luo, J., Wang, X, Chen, Z., Liu, G., Khan, M., Kang, K., Feng, Y., He, Z., Yang, X. 2020. Responses of soil bacterial community and Cd phytoextraction to a *Sedum alfredii*-oilseed rape (*Brassica napus* L. and *Brassica juncea* L.) intercropping system. *Science of The Total Environment*. 723, 138-152. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138152>.
19. Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G. a, Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C. a, Mcdonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W. a, Widmann, J., Yatsunencko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. *Nat. Publ. Gr.* 7, 335–336. doi: <https://doi.org/10.1038/nmeth0510-335>.
20. Carlon, C., 2007. Derivation Methods of Soil Screening Values in Europe: A Review and Evaluation of National Procedures Towards Harmonization. European Commission, Joint Research Centre, Ispra (EUR 22805-EN).
21. Carter, J., Rice, E., Buchberger, S., Lee, Y. 2000. Relationships between levels of

- heterotrophic bacteria and water quality parameters in a drinking water distribution system, *Water Research*, Volume 34, Issue 5, Pages 1495-1502, [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00310-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00310-3).
22. Castañeda, V., Junca, H., García, E., Montoya, O., Moreno, C., 2019. Characterization of the gastrointestinal bacterial microbiome of farmed juvenile and adult white Cachama (*Piaractus brachypomus*), *Aquaculture*, 512, 734325. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734325>.
23. Ceribasi, I, et al., 2001. Biosorption of Ni (II) and Pb (II) by *Phanaerochaete chrysosporium* from a binary metal system- kinetics. *Water SA*. 27 (1), 15-19, DOI: 10.4314/wsa.v27i1.5004.
24. Chavez, E., He, Z., Stofella, P., Mylavarapu, R., Li, Y., Moyano, B., Baligar, V., 2015. Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *Science of the Total Environment* 533. 205–214. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.106>.
25. Chavez, E., He, Z., Stoffella, P., Mylavarapu, R., Li, Y., Baligar, V. 2016. Chemical speciation of cadmium: An approach to evaluate plantavailable cadmium in Ecuadorian soils under cacao production. *Chemosphere*. 150. 57–62. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.013>.
26. Chakravarty, R and Banerjee, P., 2012. Mechanism of cadmium binding on the cell wall of an acidophilic bacterium. *Bioresource Technology* 108, 176–183. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.100>.
27. Chavez, C., et al., 2014. Traditional Fermented Foods and Beverages from a Microbiological and Nutritional Perspective: The Colombian Heritage. *Comprehensive Reviews in food science and foos safety*. 13. doi: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12098>.

28. Chen, Y., Chen, F., Xie, M., Jiang, Q., Ao, T. 2020. The impact of stabilizing amendments on the microbial community and metabolism in cadmium-contaminated paddy soils. *Chemical Engineering Journal*. 395, 125132. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125132>.
29. Chen, Y., Zhu, Q., Dong, X., Huang, W., Du, Ch., Lu, D. 2019. How *Serratia marcescens* HB-4 absorbs Cadmium and its implication on phytoremediation. *Ecology and Environmental Safety*, 185, 109723, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109723>.
30. Chi, M.-C., & Li, C.-S. 2007. Fluorochrome in Monitoring Atmospheric Bioaerosols and Correlations with Meteorological Factors and Air Pollutants. *Aerosol Science and Technology*, 41(7), 672–678. <http://doi.org/10.1080/02786820701383181>.
31. Chi, Y., Huang, Y., Wang, J., Chen, X., Chu, S., Hayat, K., Xu, Z., Xu, H., Zhou, P., Zhang, D. 2020. Two plant growth promoting bacterial *Bacillus* strains possess different mechanisms in adsorption and resistance to cadmium. *Science of the total environment* 741, 140422, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140422>.
32. Chodak, M., Go, I., Ebiewski, M., Morawska-Ploskonka, J., Kuduk, K., Niklińska, M., 2013. Diversity of microorganisms from forest soils differently polluted with heavy metals. *Appl soil Ecol*. 64, 7-14. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.11.004>.
33. Chojnacka, K. 2010. Biosorption and bioaccumulation – The prospects for practical applications. Review article. *Environment International*. 36. 299 – 307. doi:10.1016/j.envint.2009.12.001.
34. Chun, S., Kim, Y., Cui, Y., Nam, K. 2021. Ecological network analysis reveals distinctive microbial modules associated with heavy metal contamination of abandoned mine soils in Korea. *Environmental Pollution*. 289. 117851. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117851>.
35. Chun-yu, J., Xia-fang, S., Meng, Q., Qing-ya, W. 2008. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field

- soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere*, Volume 72, Issue 2, Pages 157-164 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.02.006>.
36. Cole, J., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R., Tiedje, J. (2009). The Ribosomal Database Project: Improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 37, 141–145. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn879>.
37. Daims H. 2014. The Family Nitrospiraceae. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2_126.
38. Davidova, I., Wawrik, B., Callaghan, A., Duncan, K., Marks, C., Suflita, J. 2016. *Dethiosulfatarculus sandiegensis* gen. nov., sp. nov., isolated from a methanogenic paraffin-degrading enrichment culture and emended description of the family Desulfarculaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66: 1242-1248. doi: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000864>.
39. Ding, C., Ma, Y., Li, X., Zhang, T., Wang, X. 2018. Determination and validation of soil thresholds for cadmium based on food quality standard and health risk assesment. *Science of the Total Environment*. 619-620. 700 – 706. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.137>.
40. Duan, C., Liu, Y., Zhang, H., Chen, G., Song, J. 2020. Cadmium Pollution Impact on the Bacterial Community of Haplic Cambisols in Northeast China and Inference of Resistant Genera. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 20. 1156–1170. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00201-5>.
41. Edgar, R., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461. doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>.

42. Ehsan M., K. Santamaría-Delgado, A. Vázquez-Alarcón, et al. 2009. Phytostabilization of cadmium contaminated soils by "*Lupinus uncinatus*" Schdl. Journal of Agricultural Research 7(2): 390-397.
43. EU, 2014. COMMISSION REGULATION (EU) No 488/2014 amending regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in foodstuffs. Off. J. Eur. Union 138, 75.
44. Evanko, C., Dzombak, D., 1997. Remediation of metals-contaminated soils and groundwater. Technology Evaluation Report (TE-97-01). Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center (GWR TAC - E Series). October 1997.
45. Ezekoye CC, Chikere CB, Okpokwasili GC (2018). Field Metagenomics of Bacterial Community Involved in Bioremediation of Crude Oil Polluted Soil. J Bioremediat Biodegrad 9. 5: 449. doi:10.4172/2155-6199.1000449.
46. http://www.fao.org/faostat/en/?#rankings/countries_by_commodity, 2019.
47. FEDECACAO. Departamento de Estadística y Recaudos; Reporte de Febrero 2020; Version en línea: Nelsy Yanira Alvarado; Federación Nacional de Cacaoteros: Bogotá, Colombia, 2020; disponible en web: <https://www.fedecacao.com.co/portal/index.php/es/2015-2002-2012-2017-2020-2059/nacionales> (acceso 30 Abril de 2020).
48. Feng, G., Xie, T., Wang, X., Bai, J., Tang, L., Zhao, H., Wei, W., Wang, M., Zhao, Y. 2018. Metagenomic analyst of microbial community and fuction involved in Cd Contaminated soil. BMC Microbiology. 18. 11. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1152-5>.
49. Ferreira, Paulo Ademar Avelar, Bomfeti, Cleide Aparecida, Soares, Cláudio Roberto Fonsêca de Souza, Soares, Bruno Lima, & Moreira, Fatima Maria de Souza. 2018. *Cupriavidus necator* strains: zinc and cadmium tolerance and bioaccumulation. Scientia Agricola, 75(6), 452-460. <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2017-0071>.

50. Fierer, N., Leff, J. W., Adams, B. J., Nielsen, U. N., Bates, S. T., Lauber, C. L., Owens, S., Gilbert, J. A., Wall, D. H., Caporaso, J. G., 2012. Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109, 52, 21390-21395. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1215210110>.
51. Fierer, N. 2017. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*. 15. 579–590. doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.87>.
52. Gadd, G. 1990. Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experientia* 46, 834–840. <https://doi-org.ezproxy.unal.edu.co/10.1007/BF01935534>.
53. Gómez, A., Yannarell, A., Sims, G., Cadavid, R., Moreno, C. 2011. Characterization of bacterial diversity at different depths in the Moravia Hill landfill site at Medellín, Colombia. *Soil Biology & Biochemistry* 43, 1275-1284. doi: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.02.018>.
54. Gómez-Sagasti, M. T., Alkorta, I., Becerril, J. M., Epelde, L., Anza, M., Garbisu, C., 2012. Microbial monitoring of the recovery of soil quality during heavy metal phytoremediation. *Water Air Soil Poll.* 223:3249–3262. doi: <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1106-8>.
55. Gosai, H., Sachaniya, B., Panseriya, H., Dave, B. 2018. Functional and phylogenetic diversity assessment of microbial communities at Gulf of Kachchh, India: An ecological footprint. *Ecological Indicators*. 93. 65-75. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.04.072>.
56. Gramlich, A., Tandy, S., Andres, C., Chincheros, J., Armengot, L., Scheneider, M., Schulin, R. 2016. Cadmium uptake by cocoa trees in agroforestry and monoculture systems under conventional and organic management. *Science of the Total Environment*. 580, 677 – 686. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.014>.

57. Gramlich, A., Tandy, S., Gauggel, C., López, M., Perla, D., Gonzalez, V., Schulin, R. 2018. Soil cadmium uptake by cocoa in Honduras. *Science of the Total Environment*. 612. 370 – 378. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.145>.
58. Griffin, D. et al., 2007. Airborne desert dust and aero-microbiology over the Turkish Mediterranean coastline. *Atmospheric Environment*, 41(19), 4050–4062. <http://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.01.023>.
59. Grimont, P., Grimont F., 2005. Genus: *Klebsiella*, In: Volume Two: He Proteobacteria, Part B: He Gammaproteobacteria. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (Edn.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, (2nd edn), Springer, New York, pp. 685-693.
60. Gundacker, C., Gencik, M., Hengstschläger, M., 2010. The relevance of the individual genetic background for the toxicokinetics of two significant neurodevelopmental toxicants: mercury and lead. *Mutation Research*. 705. 130–140.
61. Guo, H., Nasir, M., Lv, J., Dai, Y., Gao, J., 2017. Understanding the variation of microbial community in heavy metals contaminated soil using high throughput sequencing. *Ecotoxicology Environment Safety*. 144. 300–306.
62. Hashimoto, T., Whang, K., Nagaoka, K., 2006. A quantitative evaluation and phylogenetic characterization of oligotrophic denitrifying bacteria harbored in subsurface upland soil using improved culturability. *Biology Fertility Soils*. 42.3.179-185.
63. He, S., He, Z., Yang, X., Stoffella, P. J., Baligar, V. C., 2015. Soil biogeochemistry, plant physiology and phytoremediation of cadmium contaminated soils. *Advances in Agronomy* 134, pp. 135–225. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2015.06.005>.
64. Holmes, D., Nevin, K., Lovley, D., 2004. Comparison of 16S rRNA, *nifD*, *recA*, *gyrB*, *rpoB* and *fusA* genes within the family Geobacteraceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1591-1599. doi: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02958-0>.

65. Holmes, J., Richardson D., Saed, S., Evans-Gowing, R., Russell, A., Sodeau, J. 1997. Cadmium-specific formation of metal sulfide 'Q-particles' by *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology* 143, 2521– 2530. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-8-2521>.
66. Holmgren, G., Meyer, M., Chaney, R., Daniels, R. 1993. Cadmium, lead, zinc, copper, and nickel in agricultural soils of the United States of America. *Journal Environment Quality* 22, 335-348. doi: <https://doi.org/10.2134/jeq1993.00472425002200020015x>.
67. Huang, F., Dang, Z., Guo, Ch., Lu, X., Zhang, X., 2013. Biosorption of Cd(II) by live and dead cells of *Bacillus cereus* RC-1 isolated from cadmium-contaminated soil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Volume 107, 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.01.062>.
68. Huang, F., Guo, Ch., Lu, G., Yi, X., 2014. Bioaccumulation characterization of cadmium by growing *Bacillus cereus* RC-1 and its mechanism. *Chemosphere*, Volume 109, 134-142. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.066>.
69. Hseu, Z.Y., Chen, Z.S., Tsai, C.C., Tsui, C.C., Cheng, S.F., Liu, C.L., Lin, H.T., 2002. Digestion methods for total heavy metals in sediments and soils. *Water Air Soil Pollut.* 141, 189–205. doi: 10.1023/A:1021302405128.
70. Jan, R., Khan, M., Asaf, S., Lubna, Lee, I., Kim, K. 2019. Metal resistant endophytic bacteria reduces cadmium, nickel toxicity, and enhances expression of metal stress related genes with improved growth of *Oryza Sativa*, via regulating its antioxidant machinery and endogenous hormones. *Plants*. 8. 363. doi:10.3390/plants8100363.
71. Jensen M., Webster J. and Straus N. (1993). Method for rapid identification of bacteria based on Polymerase Chain-Reaction amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microb.* 59 (4), 945-952.

72. Jezequel, K., Lebeau, T., 2008. Soil bioaugmentation by free and immobilized bacteria to reduce potentially phytoavailable cadmium. *Bioresource Technology*, Volume 99, Issue 4, 690-698. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.02.002>.
73. Jiang, C., Sheng, X., Qian, M., Wang, Q. 2008. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere*. 72, 157 – 164. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.02.006.
74. Jiménez, C., 2015. Estado legal mundial del cadmio en cacao (*Theobroma cacao*): fantasía o realidad. Artículo de Revisión / Review Article / Artigo de Revisão. *Producción + Limpia*. 10, 1, 89–104. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S19094552015000100009&lng=en&nrm=iso.
75. Joseph, S. J., Hugenholtz, P., Sangwan, P., Osborne, C. A. y Janssen, P. H. 2003. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Applied Environment Microbiology*. 69, 7210-7215. doi: 10.1128/AEM.69.12.7210-7215.2003.
76. Kief, T., Soroker, E., Firestone, M., 1987. Microbial biomass response to a rapid increase in water potencial when dry soil is wetted. *Soil Biol. Biochem*. 19: 119 – 126 [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90070-8](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90070-8).
77. Kim, S., Jin, M., Chung, C., Yun, Y., Jahng, K., Yu, K. 2015. Biosorption of cationic basic dye and cadmium by the novel biosorbent *Bacillus catenulatus* JB-022 strain. *Journal of bioscience and bioengineering* 119, 4, 433-439. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.09.022>.
78. Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.

79. Kirkham, M. (2006). Cadmium in plants on polluted soils: effect of soil factors, hyperaccumulation and amendments. *Geoderma* 137, 19e32.
80. Kongor, J., Hinneh, M., Van de Walle, D., Afoakwa, E., Boeckx, P., Dewettinck, K. 2016. Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile — A review *Food Research International* 82, 44 – 52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.012> 0963-9969.
81. Kumari, D., Pan, X., Lee, D., Achal, V., 2014. Immobilization of *cadmium* in soil by microbially induced carbonate precipitation with *Exiguobacterium undae* at low temperature. Short communication. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Volume 94, 98-102. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.07.007>.
82. Lata, S., Kaur, H. P., & Mishra, T. (2019). Cadmium Bioremediation: a Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(9), 4120–4128. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10\(9\).4120-28](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(9).4120-28).
83. Lauber, C., Hamady, M., Knight, R., Fierer, N. (2009). Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *Applied and environmental microbiology*, Aug. 2009, p. 5111–5120 Vol. 75, No. 15. doi: 10.1128/AEM.00335-09.
84. Lazzaro, A., Hartmann, M., Blaser, P., Widmer, F., Schulin, R., Frey., B., 2006. Bacterial community structure and activity in diferent Cd-treated forest soils. *FEMS Microbiol Ecol* 58 (2006) 278–292. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00163.x>.
85. Lee, K., Liu, C., Anzai, Y., Kim, H., Aono, T., Oyaizu, H. 2005. The hierarchical system of the ‘Alphaproteobacteria’: description of *Hyphomonadaceae* fam. nov., *Xanthobacteraceae* fam. nov. and *Erythrobacteraceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55, 1907-1919. doi: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63663-0>.
86. Lemos, L. N., Fulthorpe, R. R., Triplett, E. W., & Roesch, L. F. W. (2011). Rethinking

- microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. *Journal of Microbiological Methods*, 86(1), 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.03.014>.
87. Lewin, G., Carlos, C., Chevrette, M., Horn, H., McDonald, B., Stankey, R., Stankey, R., Fox, B., Currie, C. Evolution and ecology of Actinobacteria and their bioenergy applications. *Annu Rev Microbiol.* 2016; 70: 235–254. doi:10.1146/annurev-micro-102215-095748.
88. Li, J., Liu, Y., Zhang, L., He, J. 2019. Sorption mechanism and distribution of cadmium by different microbial species. *Journal of Environmental Management.* 237. 552 – 559. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.057>.
89. Liang Xia., He Chi-Quan, Ni Gang Tang, Gui-E., Chen Xue-Ping, Lei Yan-Ru. 2014. Growth and Cd Accumulation of *Orychopragmus violaceus* as Affected by Inoculation of Cd-Tolerant Bacteria Strains. *Pedosphere* 24(3): 322-329. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(14\)60018-7](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(14)60018-7).
90. Li, Y., Yu, X., Cui, Y., Tu, W., Shen, T., Yan, M., Wei, Y., Chen, X., Wang, Q., Chen, Q., Gu, Y., Zhao, K., Xiang, Q., Zou, L., Ma, M. 2018. The potential of cadmium ion-immobilized *Rhizobium pusense* KG2 to prevent soybean root from absorbing cadmium in cadmium-contaminated soil. *Journal of Applied Microbiology.* 126. 919 – 930. doi:10.1111/jam.14165.
91. Liu H, Xie Y, Li J, Zeng G, Li H, Xu F, Feng S, Xu H (2020) Effect of *Serratia* sp. K3 combined with organic materials on cadmium migration in soil-*Vetiveria zizanioides* L. system and bacterial community in contaminated soil. *Chemosphere* 242:125164. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125164>.
92. Ludlow, C., Cromie, G., Garmendia-Torres, C., Sirr, A., Hays, M., Field, C., Jeffery, E., Fay, J., Dudley, A. 2016. Independent Origins of Yeast Associated with Coffee and Cacao Fermentation. *Current biology* 26, 965 – 971. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2016.02.012>.

93. Luo, L., Xie, I., Jin, D., Mi, B., Wang, D., Dai, X., Zou, X., Zhang, Z., 2019. Bacterial community response to cadmium contamination of agricultural paddy soil. *Applied Soil Ecology*, 139, 100-106. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.03.022>.
94. Ma, Y.; Wang, Y.; Chen, Q.; Li, Y.; Guo, D.; Nie, X.; Peng, X. Assessment of heavy metal pollution and the effect on bacterial community in acidic and neutral soils. *Ecol. Indic.* 2020, 117, 106626
95. Madigan, M.T., J.M. Martinko, D.A. Stahl, D.P. Clark. 2012. *Brock Biology of Microorganisms*, 13^a ed. Benjamin Cummings.
96. McGrath, S., Zhao, F., Dunham, S., Crosland, A., Coleman, K. 2000. Long term changes in the extractability and bioavailability of Zinc and Cadmium after sludge application. *Journal of environment quality*. 29, 3, 875-883. doi: <https://doi.org/10.2134/jeq2000.00472425002900030025x>.
97. Mann, C., Lynch, D., Fillmore, S., Mills, A. 2019. Relationships between field management, soil health, and microbial community composition. *Applied Soil Ecology* 144, 12-21. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.06.012>.
98. McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.
99. Mantilla, L., Bissig, T., Valencia, V., Hart, C. 2013. The magmatic history of the Vetas-California mining district, Santander Massif, Eastern Cordillera, Colombia. *Journal of South American Earth Sciences*, 45. 235-249. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jsames.2013.03.006>.
100. Mathew, B.B., Biju, V.G. & Nideghatta Beeregowda, K. Accumulation of lead (Pb II) metal ions by *Bacillus toyonensis* SCE1 species, innate to industrial-area ground water and nanoparticle synthesis. *Appl Nanosci* 9, 49–66 (2019). <https://doi.org/10.1007/s13204-018-0892-8>.

101. Margensin, R. P., Laza, G. A., Kasenbacher, S. 2011. Characterization of bacterial communities at heavy-metal-contaminated sites. *Chemosphere*. 82, 1583–1588. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.11.056>.
102. Ministerio de Agricultura 2019. Agronet: Reporte: Área, Producción, Rendimiento y Participación Municipal en el Departamento por Cultivo. <https://www.agronet.gov.co>.
103. Meter, A., Atkinson, R. J., & Laliberte, B. (2019). Cadmium in Cacao From Latin America and The Caribbean. A Review of Research and Potential Mitigation Solutions. Caracas: CAF. Retrieved from <http://scioteca.caf.com/handle/123456789/1506>
104. Mite, F., Carrillo, M., Durango, W., 2010. Avances del monitoreo de presencia de Cadmio en almendras de Cacao, suelos y aguas en Ecuador. XII congreso ecuatoriano de la ciencia del Suelo. Santo Domingo, 17-19 de noviembre del 2010.
105. Mitra, S., Pramanik, K., Kumar, P., Soren, T., Sarkar, A., Sundar, R., Pandey, S., Kanti, T. 2018. Characterization of Cd-resistant *Klebsiella michiganensis* MCC3089 and its potential for rice seedling growth promotion under Cd stress, *Microbiological Research*. 210. 12-25, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.03.003>.
106. Mohapatra, B., Gould, W., Dinardo, O., Koren, D., 2011. Tracking the prokaryotic diversity in acid mine drainage-contaminated environments: a review of molecular methods. *Minerals Engineer*. 24, 709–718.
107. Montaña, P.C.; Nova, G.; Bayona, G.; Mahecha, H.; Ayala, C.; Jaramillo, C.; De La Parra, F. 2016. Análisis de secuencias y procedencia en sucesiones sedimentarias de grano fino: Un ejemplo de la formación Umir y base de la formación Lisama, en el sector de Simacota (Santander, Colombia). *Boletín Geología*, 38, 51–72.
108. Moreno C., Romero J. and Espejo R. (2002). Polymorphism in repeated 16S rRNA genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio*. *Microbiology* 148 (4), 1233-1239. DOI: 10.1099/00221287-148-4-1233.

109. Motamayor, J. C., Risterucci, A. M., López, P. A., Ortiz, C. F., Moreno, A., & Lanaud, C. 2002. Cacao domestication I: The origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity*, 89(5), 380–386. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800156>
110. Engbersen, N., Gramlich, A., Lopez, M., Schwarz, G., Hattendorf, B., Gutierrez, O., Schulin, R. 2019. Cadmium accumulation and allocation in different cacao cultivars. *Science of the Total Environment*. 678. 660–670 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.001>.
111. Naomi L., Challacombe, J., Janssen, P., Henrissat, B., Coutinho, P., Wu, M., Xie, G., Haft, D., Sait, M., Badger, J., Barabote, R., Bradley, B., Brettin, T., Brinkac, L., Bruce, D., Creasy, T., Daugherty, S., Davidsen, T., DeBoy, R., Detter, C., Dodson, R., Durkin, S., Ganapathy, A., Gwinn-Giglio, M., Han, C., Khouri, H., Kiss, H., Kothari, S., Madupu, R., Nelson, K., Nelson, W., Paulsen, I., Penn, K., Ren, Q., Rosovitz, M., Selengut, J., Shrivastava, S., Sullivan, S., Tapia, R., Thompson, S., Watkins, S., Yang, Q., Yu, C., Zafar, N., Zhou, L., Kuske C. 2009. Three genomes from the Phyla Acidobacter provide insight into the lifestyles of these microorganism in soils. *Applied and environmental microbiology*, p. 2046–2056. doi:10.1128/AEM.02294-08.
112. Navarrete, A., Soares, T., Rossetto, R., Van Veen, J., Tsai, S., Kuramae, E. Verrucomicrobial community structure and abundance as indicators for changes in chemical factors linked to soil fertility. *Antonie van Leeuwenhoek* (2015) 108:741–752. doi: 10.1007/s10482-015-0530-3.
113. Nies, D. 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology Biotechnology*. 51. 730–750. <https://doi-org.ezproxy.unal.edu.co/10.1007/s002530051457>.
114. Nies, D. 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 2-3, 313 – 339, [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00048-2](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00048-2).
115. NTC 4113-6. 2017. Gestión Ambiental. Calidad de suelo. Muestreo. Guía para la recolección, manejo y almacenamiento de suelo para la evaluación de procesos

- microbianos aeróbicos en el laboratorio. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC) 2016. <https://www.icontec.org>.
116. Oladipo, O., Ezeokoli, O., Maboeta, M., Bezuidenhout, J., Tiedjt, L., Jordaan, A., Bezuidenhout, C. 2018. Tolerance and growth kinetics of bacteria isolated from gold and gemstone mining sites in response to heavy metal concentrations, *Journal of Environmental Management*, 212, 357-366, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.01.038>.
117. Oren A., Xu XW. (2014) The Family *Hyphomicrobiaceae*. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_257.
118. Osorio, W., Ruiz, O. 2013. Guía para el muestreo. Laboratorio de suelos. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, Colombia. <https://ciencias.medellin.unal.edu.co/laboratorios/suelos/>.
119. Ozdemir, S., Kilinc, E., Poli, A., Nicolaus, B., Güven, K. 2009. Biosorption of Cd, Cu, Ni, Mn and Zn from aqueous solutions by thermophilic bacteria, *Geobacillus toebii* sub.sP. *Decanicus* and *Geobacillus thermoleovorans* sub.sP. *stromboliensis*: equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Chem. Eng. J.*, 152 (1) (2009), pp. 195-206, [10.1016/j.cej.2009.04.041](https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.04.041).
120. Pabon, M., Sepúlveda, W., Herrera, L., 2014. Caracterización de la producción de cacao en Santander y análisis de la presencia de Cadmio en los suelos y cultivos. Proyecto de investigación financiado por Colciencias Convocatoria 586 de 2012, Contrato 822 de 2012. <http://repositorio.colciencias.gov.co:80/handle/11146/2441>.
121. Parada, A. E., Needham, D. M., & Fuhrman, J. A. (2016). Every base matters: Assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental Microbiology*, 18(5), 1403–1414. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13023>

122. Park, Y., Ko, J., Yun, S., Lee, E., Kim, S., Kang, S., Lee, B., Kim, S. 2008. Enhancement of bioremediation by *Ralstonia* sp. HM-1 in sediment polluted by Cd and Zn. *Bioresource Technology* 99, 7458-7463. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.024>.
123. Pathom, W., Nogi, Y., Ward, A., Horikoshi, K., Bull, A., Goodfellow, M. (2006). *Dermacoccus barathi* sp. nov., novel actinomycetes isolated from Deep-sea mud of the Mariana Trench. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56, 2303-2307. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64250-0>.
124. Pereira De Araújo, R., De Almeida, A., Pereira, L., Mangabeira, P., Souza, J., Pirovania, C., Ahnerta, D., Baligarc, V. 2017. Photosynthetic, antioxidative, molecular and ultrastructural responses of young cacao plants to Cd toxicity in the soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 144, 148 – 157. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.006>.
125. Pereira, L., Vicentini, R., Ottobini, L. 2015. Short Communicarion. Characterization of the core microbiota of the drainage and surrounding soil of Brazilian copper mine. *Genet. Mol. Biol.* 38, 4, 484-489. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-475738420150025>.
126. Pérez-Jaramillo, J.E., Carrión, V.J., Bosse, M., Ferrão, L.F.V., De Hollander, M., Garcia, A.A.F., Ramírez, C.A., Mendes, R., Raaijmakers, J.M., 2017. Linking rhizosphere microbiome composition of wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* to genotypic and root phenotypic traits. *ISME J.* 11, 2244–2257. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.85>.
127. Porras, L., Torres, J., Gil, M., Martinez, O. 2019. Effect of the solar drying process on the sensory and chemical quality of cocoa (*Theobroma cacao* L.) cultivated in Antioquia, Colombia. *Food Research International* 115, 259-267. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.084>.

128. Prabha K. Padmavathiamma & Loretta Y. Li Phytoremediation Technology: Hyper-accumulation Metals in Plants. *Water Air Soil Pollut* (2007) 184:105–126. DOI 10.1007/s11270-007-9401-5.
129. Pramanik, K., Mitra, S., Sarkar, A., Kanti, T. 2018. Alleviation of phytotoxic effects of cadmium on rice seedlings by cadmium resistant PGPR strain *Enterobacter aerogenes* MCC 3092, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 351, Pages 317-329, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.03.009>.
130. Prosser J.I., Head I.M., Stein L.Y. (2014) The Family Nitrosomonadaceae. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_372.
131. Pugazhendhi, A., Boovaragamoorthy, G., Ranganathan, K., Naushad, M., Kaliannan, T. 2018. New insight into effective biosorption of lead from aqueous solution using *Ralstonia solanacearum*: Characterization and mechanism studies. *Journal of cleaner production*, 174, 1234-1239. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.11.061>.
132. Qi, F., Lamb, D., Naidu, R., Bolan, N., Yan, Y., Ok, Y., Rahman, M., Choppala, G. 2018. Cadmium solubility and bioavailability in soils amended with acidic and neutral biochar. *Sci Total Environ* 610:1457–1466. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.228>.
133. Rajendran, P., Muthukrishnan, J., Gunasekaran, P. 2003. Microbes in heavy metal remediation. *Indian Journal of Experimental Biology*. 41, 935-944.
134. Ryan T. Jones, et al., 2009. A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses, *ISME J*. 3. 4. 442–453.
135. Rodríguez Albarracín, H.S.; Darghan Contreras, A.E.; Henao, M.C. Spatial regression modeling of soils with high cadmium content in a cocoa producing area of

- central Colombia. *Geoderma Reg.* 2019, 16, 1–13. doi: <https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2019.e00214>.
136. Nelino, R., Hildauro, J., Paucar, G., Salinas, S., Mamani, F., García, T. 2019. Efecto del compost y NPK sobre los niveles de microorganismos y cadmio en suelo y almendra de cacao. *Revista de Investigaciones Altoandinas.* 21, 4. <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2019.503>.
137. Sabir, A., Naveed, M., Bashir, M., Hussain, A., Mustafa, A., Zahir, Z., Kamran, M., Ditta, A., Núñez-Delgado, A., Saeed, Q., Qadeer, A. 2020. Cadmium mediated phytotoxic impacts in *Brassica napus*: Managing growth, physiological and oxidative disturbances through combined use of biochar and *Enterobacter* sp. MN17. *Journal of Environmental Management.* 265. 110522. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110522>.
138. Saitou N. and Nei M. (1987). The Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4 (4), 406-425. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
139. Sangkhobol, V., Skerman, B. 1981. Chitinophaga, a new genus of Chitinolytic myxobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 31, 3, pág.: 285 – 293. <https://doi.org/10.1099/00207713-31-3-285>.
140. Sauvé, S, Norvell, W.A, McBride, M. Hendershot, W. Speciation and complexation of cadmium in extracted soil solutions. *Environmental Science and Technology* Volume 34, Issue 2, 15 January 2000, Pages 291-296. DOI: 10.1021/es990202z.
141. Sea, B., Wendell, A., Murray, M., Hendershot, W. 2000. Speciation and Complexation of Cadmium in Extracted Soil Solutions. *Environ. Sci. Technol.* 2000, 34, 291-296. doi: 10.1021/es990202.

142. Shahid, M., Dumat, C., Khalid, S., Niazi, N., Antunes, P. 2016. Cadmium bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soilplant system. *Rev Environ Contam Toxicol* 241:73–137 DOI: 10.1007/398_2016_8.
143. Shamin, S. and Rehman, A. 2012. Cadmium resistance and accumulation potential of *Klebsiella pneumoniae* strain CBL-1 isolated from industrial wastewater. *Pakistan J. Zool.*, 44, 1, 203-208.
144. She, J., Wang, J., Wei, X., Zhang, Q., Xie, Z., Beiyuan, J., Xiao, E., Yang, X., Liu, J., Zhou, Y., Xiao, T., Wang, Y., Chen, N., Tsang, D. 2021. Survival strategies and dominant phylotypes of maize-rhizosphere microorganisms under metal(loid)s contamination. *Science of The Total Environment*. 774. 145143. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145143>.
145. Sheng, Y., Wang, Y., Yang, X., Zhang, B., He, X., Xu, W., Huang, K. 2016. Cadmium tolerant characteristic of a newly isolated *Lactococcus lactis subsp. lactis*. *Environmental toxicology and pharmacology*. 48, 183-190. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.10.007>.
146. Shi, Z., Zhang, Z., Yuan, M., Wang, S., Yang, M., Yao, O., Ba, W., Zhao, J., Xie, B. 2020. Characterization of a high cadmium accumulating soil bacterium, *Cupriavidus* sp. WS2, *Chemosphere*, Volume 247, 125834, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125834>.
147. Siripornadulsil, S. and Siripornadulsil, W. 2013. Cadmium-tolerant bacteria reduce the uptake of cadmium in rice: Potential for microbial bioremediation, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 94, Pages 94-103, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.05.002>.
148. Song L, Pan Z, Dai Y, Chen L, Zhang L, Liao Q, Yu X, Guo H, Zhou G. 2020. Characterization and comparison of the bacterial communities of rhizosphere and bulk

soils from cadmium-polluted wheat fields. PeerJ 8:e10302
<http://doi.org/10.7717/peerj.10302>.

149. Soliman, T., Yang, S., Yamazaki, T., Kodama, H. 2017. Profiling soil microbial communities with next-generation sequencing: the influence of DNA kit selection and technician technical expertise. PeerJ 5:e4178. doi: <https://doi.org/10.7717/peerj.4178>.
150. Spain, A., Krumholz, L., Elshahed, M. 2009. Abundance, composition, diversity and novelty of soil Proteobacteria. The ISME Journal (2009) 3, 992–1000; doi:10.1038/ismej.2009.43.
151. Sriram, M. I., Gayathiri, S., Gnanaselvi, U., Jenifer, P. S., Mohan Raj, S., & Gurunathan, S. (2011). Novel lipopeptide biosurfactant produced by hydrocarbon degrading and heavy metal tolerant bacterium *Escherichia fergusonii* KLU01 as a potential tool for bioremediation. Bioresource Technology, 102, 9291-9295 doi:10.1016/j.biortech.2011.06.094.
152. Stefanowicz, A. M., Niklinska, M., Kapusta, P., Szarek-Łukaszewska, G., 2010. Pine forest and grassland differently influence the response of soil microbial communities to metal contamination. Sci Total Environ. 408,6134–6141.doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.08.056>.
153. Stuart, E., Jones, J., Lennon, T. 2010. Dormancy contributes to the maintenance of microbial diversity. Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am. 107. 13. 5881–5886.
154. Sun, R., Wang, L., Huang, R., Huang, F., Gan, D., Wang, J., Guan, R., Han, W., Qu, J., Yan, L., Zhang, Y. 2020. Cadmium resistance mechanisms of a functional strain *Enterobacter* sp. DNB-S2, isolated from black soil in Northeast China, Environmental Pollution, Volume 263, Part B, 114612, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114612>.
155. Sun, L. N., Zhang, Y. F., He, L. Y., Chen, Z. J., Wang, Q. Y., Qian, M., Sheng, X. F., 2010. Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland. Bioresource Technology. 101,501–509. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.011>.

156. Sun, R., Wang, L., Huang, R., Huang, F., Gan, D., Wang, J., Guan, R., Han, W., Qu, J., Yan, L., Zhang, Y. 2020. Cadmium resistance mechanisms of a functional strain *Enterobacter* sp. DNB-S2, isolated from black soil in Northeast China. *Environmental Pollution*. 263, 114612. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114612>.
157. Sylvia, D., Fuhrmann, J., Hartel, P., Zuberer, D. 2005. Principles and applications of soil microbiology. Prentice Hall. New Jersey, USA. 53. 218 – 256.
158. Tchakounté, G., Berger, B., Patz, S., Fankem, H., Ruppel, S. 2018. Community structure and plant growth-promoting potential of cultivable bacteria isolated from Cameroon soil. *Microbiological Research*. 214. 47-59. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.05.008>.
159. Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
160. Tossapol, L., Sooksawat, N., Sumarnrote, A., Awutpet, T., Kruatrache, M., Pokethitiyook, P., Auesukaree, C. 2015. Bioaccumulation and biosorption of Cd²⁺ and Zn²⁺ by bacteria isolated from a zinc mine in Thailand. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 122, 322 – 330, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.08.013>.
161. Uribe, A., Méndez H. y Mantilla J. (2009). Efecto de niveles de nitrógeno, fósforo y potasio sobre la producción de cacao en suelo del Departamento de Santander. *Revista Suelos Ecuatoriales*, Nro. 28:31-36.
162. US Department of Health and Human Services. 2008. Draft Toxicological Profile for Cadmium. Atlanta, Georgia. Agency for Toxic Substances and Disease Registry Division of Toxicology and Human Health Sciences (proposed) Environmental Toxicology Branch (proposed).

163. USEPA soil screening Levels. 2013. Versión 1. <http://www.gahp.net/new/wp-content/uploads/2013/12/GUIDANCE-ON-SCREENING-LEVELS-Version-1-Dec-2013.pdf>.
164. Vanderschueren, R., Argüello, D., Blommaert, H., Montalvo, D., Barraza, F., Maurice, L., Schreck, E., Schulin, R., Lewis, C., Vazquez, J., Umaharan, P., Chavez, E., Sarret, G., Smolders, E. 2021. Mitigating the level of cadmium in cacao products: Reviewing the transfer of cadmium from soil to chocolate bar. *Science of The Total Environment*. 781, 146779. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146779>.
165. Valls, M., Gonzalez-Duarte, R., Atrian, S., De Lorenzo, V., 1998. Bioaccumulation of heavy metals with protein fusions of metallothionein to bacterial OMPs. *Biochimie* 80, 855–861. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)88880-X](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)88880-X).
166. Veglio, F. and Beolchini, F., 1997. Removal of metals by biosorption: a review. *Hydrometallurgy*. 44, 3, 301 – 316, [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(96\)00059-X](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(96)00059-X).
167. Venkatachalam, S., Vatharamattathil, M., Vadakke, S., Dinesh, L., Mahesh, M., Kottekkatu, K. Bacterial diversity and community structure along the glacier foreland of Midtre Lovénbreen, Svalbard, Arctic. 2021. *Ecological Indicators*. 126. 107704. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107704>.
168. Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H., 2009. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 364–372. DOI: 10.1016/j.pbi.2009.05.001.
169. Vijayaraghavan, K., and Yun, Y.S., 2008. Bacterial biosorbents and biosorption, *Biotechnology Advances*, 26, 3, 266–291, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.02.002>.
170. Wang, G., Yang, D., Wang, W., Ji, J., Jin, C., Guan, C. 2021. Endophytic bacteria associated with the enhanced cadmium resistance in *NHX1*- overexpressing tobacco

- plants. *Environmental and Experimental Botany*. 188. 104524. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104524>.
171. Wang, X., Ya, T., Zhang, M., Liu, L., Hou, P., Hou, P., Lu, S. 2019. Cadmium (II) alters the microbial community structure and molecular ecological network in activated sludge system. *Environmental Pollution*. 255. 113225. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113225> 0269-7491.
172. Wang, M., Ahrné, M., Antonsson, M., Molin, G. 2004. T-RFLP combined with principal component analysis and 16S rRNA gene sequencing: an effective strategy for comparison of fecal microbiota in infants of different ages. *Journal of microbiological methods*, 59, 1, 53 – 69. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.06.002>.
173. Wang, Q.; Garrity, G.M.; Tiedje, J.M.; Cole, J.R. 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied Environment Microbiology*. 73. 5261. doi: 10.1128/AEM.00062-07.
174. Wang, T., Sun, H., Jiang, C., Mao, H., Zhang, Y. 2014. Immobilization of Cd in soil and changes of soil microbial community by bioaugmentation of UV-mutated *Bacillus subtilis* 38 assisted by biostimulation. *European Journal of Soil Biology*, 65, 62 – 69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.10.001>.
175. Wang, Q., Li, Q., Lin, Y., Hou, Y., Deng, Z., Liu, W., Wang, H., Xia, Z. 2020. Biochemical and genetic basis of cadmium biosorption by *Enterobacter ludwigii* LY6, isolated from industrial contaminated soil. *Environmental pollution* 264, 114637, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114637>.
176. Wang, Y., Shi, J., Wang, H., Lin, Q., Chen, X., Chen, Y. 2007. The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67, 1, 75-81. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.03.007>.
177. Wang, J., Yao, J., Zening, Y., Guan, J., Chenyu, L., Lixin, L., 2017. Analysis of

Bacterial Community Structure and Diversity in Different Restoration Methods in Qixing River Wetland. *Adv. J. Toxicol. Curr. Res.* 201. 1. 2, 049-055.

178. Welch, R., 2006. The genus *Escherichia*. *Procarriotes* 6: 60-71 Chapter 3.3.3. DOI: 10.1007/0-387-30746-x_3.
179. Worden, C.R., Kovac, W.K., Dorn, L.A. and Sandrin, T.R. 2009. Environmental pH affects transcriptional responses to cadmium toxicity in *Escherichia coli* K-12 (MG1655). *FEMS Microbiol Letters*, 293, 1, 58–64. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01508.x>.
180. Woldetsadik, D., Drechsel, P., Keraita, B, et al. 2016. Effects of biochar and alkaline amendments on cadmium immobilization, selected nutrient and cadmium concentrations of lettuce (*lactuca sativa*) in two contrasting soils. *SpringerPlus*. 5, 397, <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2019-6>.
181. Wong, C and Cobbett, C., 2009. HMA P-type ATPases are the major mechanism for root to shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 181, 71-78, <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02638.x>.
182. World Health Organization, 2010. Exposure to cadmium: a major public health concern. *Preventing Disease Through Healthy Environments*.
183. Wu, W.C., Dong, C.X., Wu, J.H., Liu, X.W., Wu, Y.X., Chen, X.B., et al., 2017. Ecological effects of soil properties and metal concentrations on the composition and diversity of microbial communities associated with land use patterns in an electronic waste recycling region. *Sci. Total Environ.* 601, 57–65.
184. Xiaoqi, L., Delong, M., Juan L., Huaqun Y., Hongwei, L., Xueduan, L., Cheng, C., Yunhua, X., Zhenghua, L., Mingli, Y. 2017. Response of soil microbial communities and microbial interactions to long-term heavy metal contamination, *Environmental Pollution*, Volume 231, Part 1, Pages 908-917, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.057>.

185. Xiaoxi Zeng, Hong Xu, Jijie Lu, Qimin Chen, Wen Li, Ling Wu, Jianxin Tang & Liang Ma. The immobilization of soil Cadmium by the combined amendment of bacteria and Hydroxyapatite. *Scientific reports* (2020) 10:2189 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58259-1>.
186. Xie, Y., Li, H., Wang, X., Son, Ng., Lu, Y., Jing, K. 2014. Kinetic simulating of Cr (VI) removal by the waste *Chlorella vulgaris* biomass. *Journal of the Taiwan institute of chemical engineers*. 45, 4, 1773 – 1782, <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2014.02.016>.
187. Xu, C., He, S., Liu, Y., Zhang, W., Lu, D. 2017. Bioadsorption and biostabilization of cadmium by *Enterobacter cloacae* TU, *Chemosphere*, Volume 173, Pages 622-629, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.005>.
188. Xue, W., Peng, Z., Huang, D., Zeng, G., Wan, J., Xu, R., Cheng, M., Zhang, C., Jiang, D., Hu, Z. 2018. Nanoremediation of cadmium contaminated river sediments: Microbial response and organic carbón changes. *Journal of hazardous materials*, 290 – 299. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.062>.
189. Yadav, S. K., 2010. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 76 (2), 167–179, doi:10.1016/j.sajb.2009.10.007.
190. Yang, Z., Zijan, W., Liao, Y., Liao, Q., Yang, W., Chai, L. 2017. Combination of microbial oxidation and biogenic schwertmannite immobilization: a potential remediation for highly arsenic-contaminated soil. *Chemosphere*. 181, 1–8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.041>.
191. Yang, Y., Chen, W., Wang, M., Peng, C., 2016. Regional accumulation characteristics of cadmium in vegetables: influencing factors, transfer model and indication of soil threshold content. *Environ. Pollut.* 219, 1036e1043. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.003>.

192. Yim, O., & Ramdeen, K. (2015). Hierarchical Cluster Analysis: Comparison of Three Linkage Measures and Application to Psychological Data. *The Quantitative Methods for Psychology*. 11, 1, 8–21. <https://doi.org/10.20982/tqmp.11.1.p008>.
193. Yin, P., Liu, X., Liao, J and Hu, X. 2019. Effects od cadmium stress on Microbial diversity in soil potted with *Sasa Argenteastriatus*. *IOP Conference Series Earth and Environmental Science*. 300: 052051. doi:10.1088/1755-1315/300/5/052051.
194. Yin, K., Wang, Q., Lv, M., Chen, L. 2019. Review. Microorganism remediation strategies towards heavy metals. *Chemical Engineering Journal*. 360, 1553-1563. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.10.226>.
195. Yun, B., Malik, A., Kim, S. 2020. Genome based characterization of *Kitasatospora* sp. MMS16-BH015, a multiple heavy metal resistant soil actinobacterium with high antimicrobial potential. *Gene*. 733. 144379. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144379>.
196. Zao, M., Zhang, C., Zeng, G., Huang, D., Xu, P., Cheng, M. 2015. Growth, metabolism of *Phanerochaete chrysosporium* and route of lignin degradation in response to cadmium stress in solid-state fermentation. *Chemosphere* 138, 560 – 567, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.07.019>.
197. Zhang, Y., Cong, J., Lu, H., Li, G., Qu, Y., Su, X., Zhou, J., Li, D. 2014. Community structure and elevational diversity patterns of soil Acidobacteria. *Journal of Environmental Sciences*. 26. 1717 – 1724. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jes.2014.06.012> 1001-0742.
198. Zhang, J., Li, Q., Zeng, Y., Zhang, J., Lu, G., Dang, Z., Guo, Ch. 2019. Bioaccumulation and distribution of cadmium by *Burkholderia cepacia* GYP1 under oligotrophic condition and mechanism analysis at proteome level. *Ecotoxicology and environmental safety* 176, 162-169. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.091>.

199. Zhou, J., Li, P., Meng, D., Gu, Y., Zheng, Z., Yin, H., Zhou, Q., Li, J. 2020. Isolation, characterization and inoculation of Cd tolerant rice endophytes and their impacts on rice under contaminated environment. *Environmental pollution*, 260, 113990. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.113990>.
200. Ziagova, M., Dimitriadis, G., Aslanidou, D., Papaioannou, E., Tzannetaki, L., Kyriakides, M., 2007. Comparative study of Cd (II) and Cr (VI) biosorption on *Staphylococcus xylosus* and *Pseudomonas* sp. in a single and binary mixtures. *Bioresource Technology* 98, 2859 – 2865. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.043>.
201. Zoropogui, A., Gambarelli, S., Covès, J., 2008. *CzcE* from *Cupriavidus metallidurans* CH34 is a copper-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365(4), 735–739. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.11.030>.
202. Zug, M., Yupanqui, H., Meyberg, F., Cierjacks, J., Cierjacks, A. 2019. Cadmium Accumulation in Peruvian Cacao (*Theobroma cacao* L.) and Opportunities for Mitigation. *Water Air Soil Pollut*, 230: 72 <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4109-x>.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

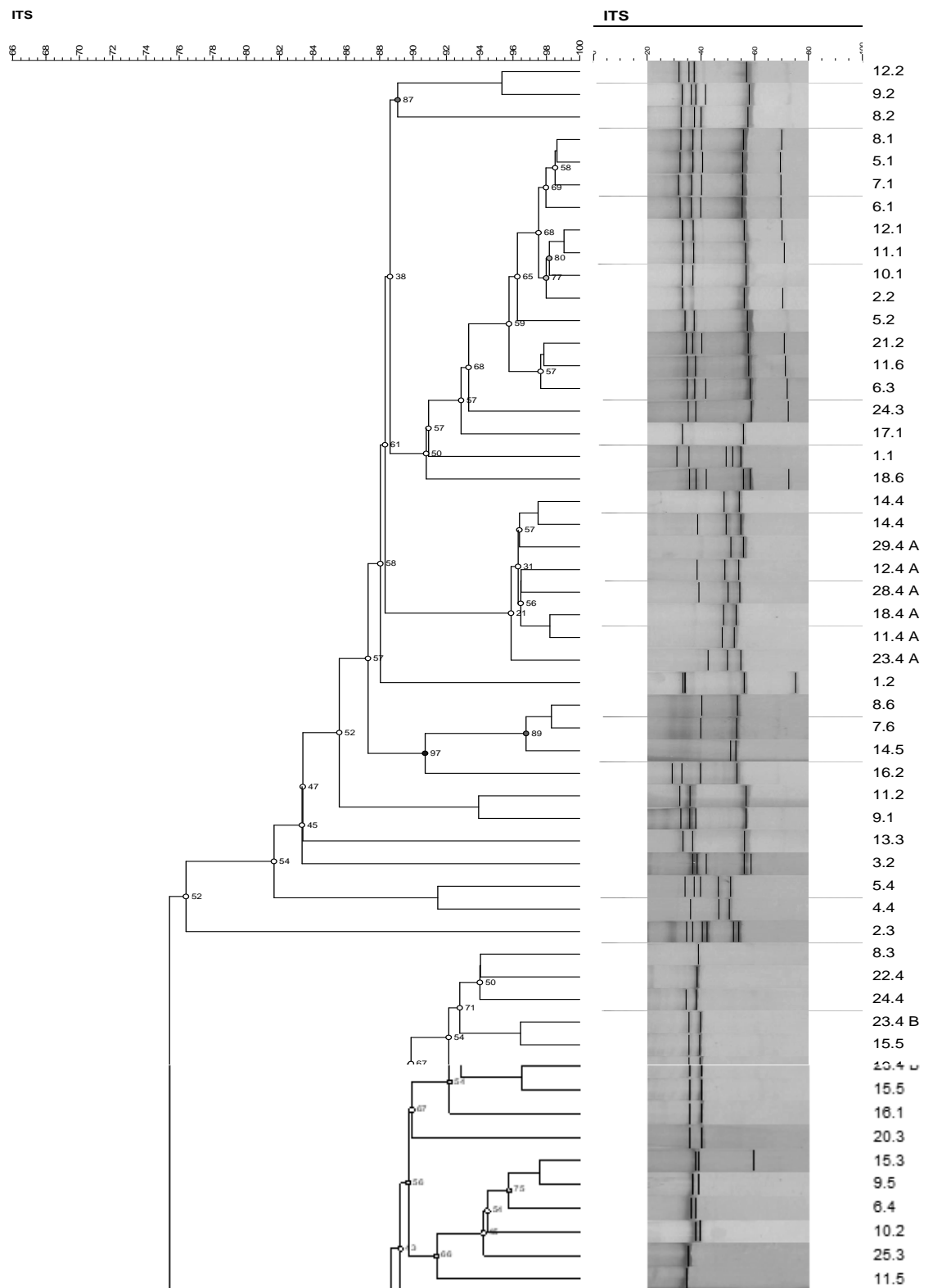


Figura. S1 (a). Dendrograma parcial ITS de bacterias tolerantes a Cd usando Software GelCompar II. porcentaje de agrupamiento con similitud del 90%.

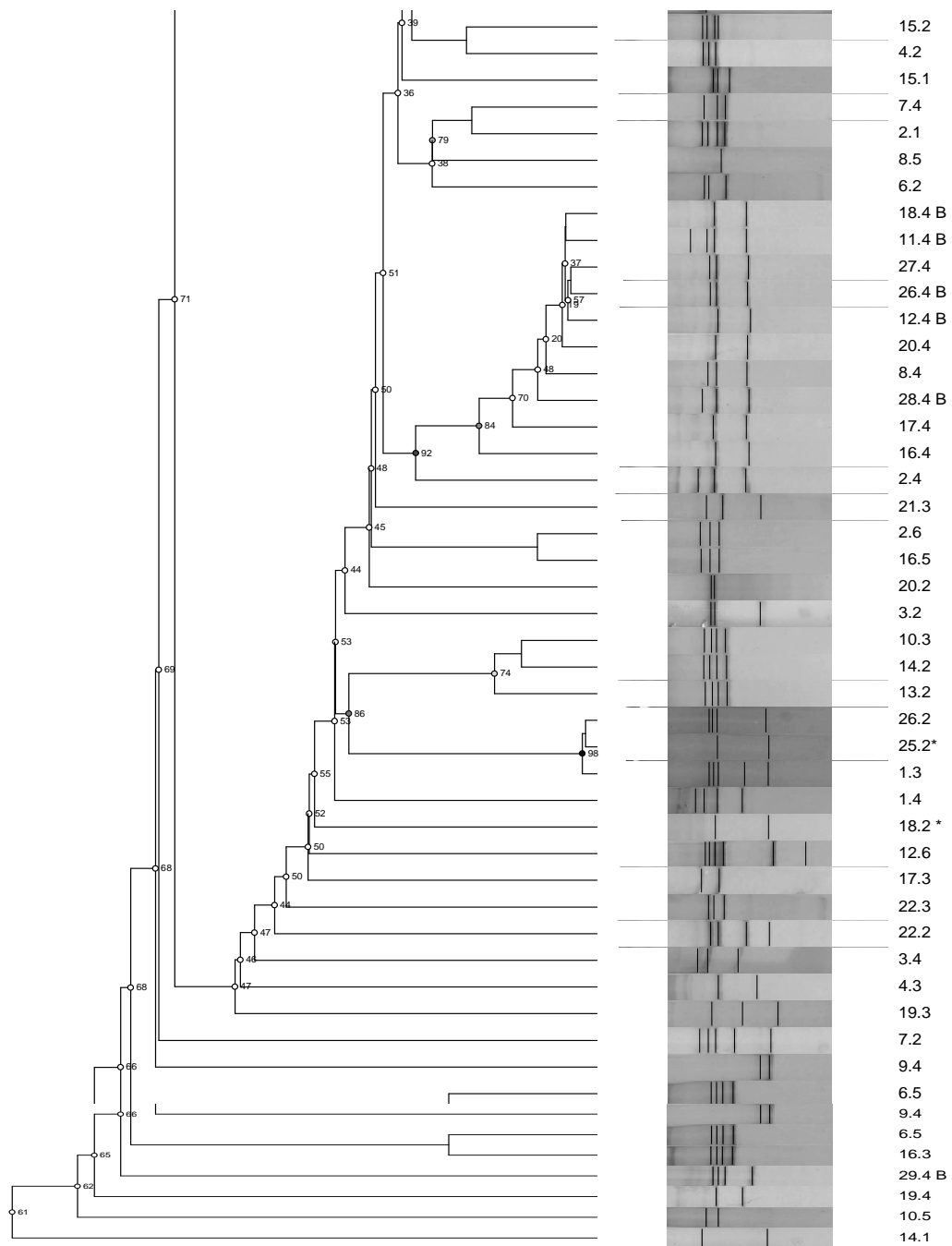
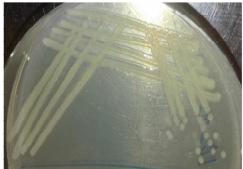

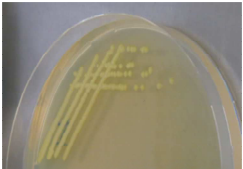

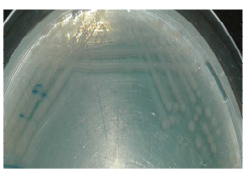
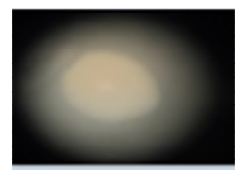
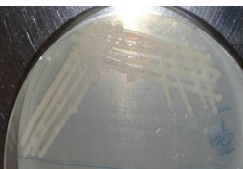


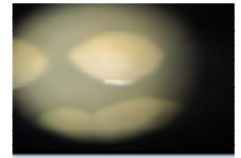
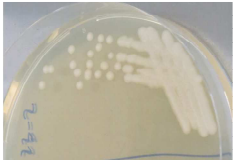


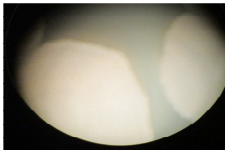




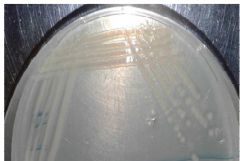
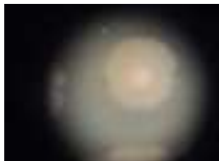
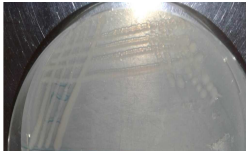
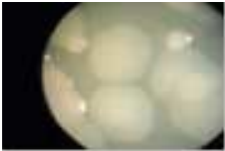
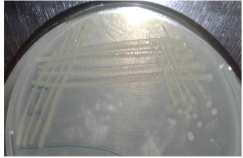

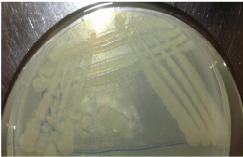

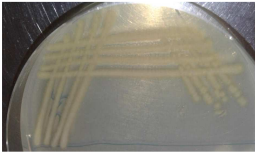
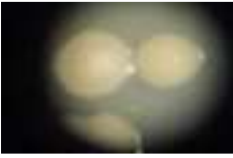
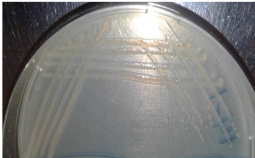



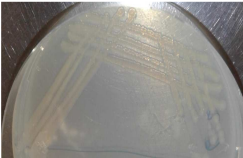












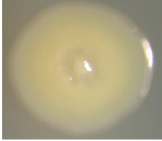

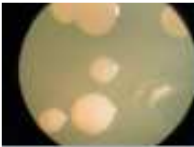
Figura. S1 (b). Dendrograma parcial ITS de bacterias tolerantes a Cd usando Software GelCompar II. porcentaje de agrupamiento con similitud del 90%.

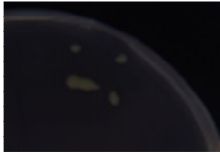

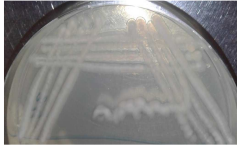

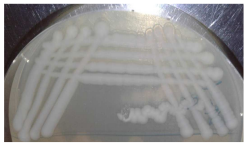


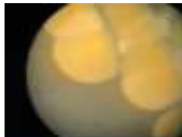






Figura S2. Morfología de colonias aisladas tolerantes a Cd (Fuente: autor)

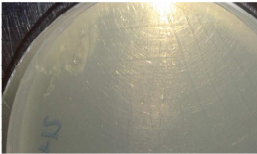

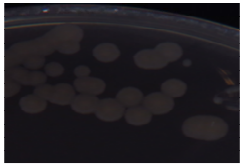



Código aislado	Placa	Colonia vista al Estereoscopio	Descripción
10-2			Colonias pulvinadas cremosas brillantes regular blancas circulares
7-1			Colonias amarillas intensas circulares borde regular brillantes
9-1			Colonias blancas cremosas circulares brillantes convexas regular
18-1			Colonia blanca cremosa intensa circular brillante regular pulvinada
3-2			Colonias amarillas intensas circulares borde regular brillantes

Código aislado	Placa	Colonia vista al Estereoscopio	Descripción
23-2			Colonias pulvinadas blancas cremosas brillantes circulares con borde regular
8-5			Colonias planas fusiformes con bordes rizados, blancas opacas cerosas.
10-1			Colonias blancas intensas brillantes convexas con borde regular cremosas
17-2			Colonias amarillo claro, planas con borde regular circulares
17-1			Colonias pulvinadas cremosas brillantes borde regular circulares
15-1			Colonia convexa blanca cremosa con borde regular brillante fusiforme

Código aislado	Placa	Colonia vista al Estereoscopio	Descripción
1-2			Colonias cremas circulares pulvinadas con borde regular brillantes
4-2			Colonias irregulares de aspecto ceroso de color café claro
7-2			Colonias amarillo planas borde regular circulares
14-1			Colonia pulvinada blanca traslucida borde regular circular
16-1			Colonias amarillas intensas brillantes circulares borde regular convexas
6-2			Colonias circulares color café brillantes borde regular

Código aislado	Placa	Colonia vista al Estereoscopio	Descripción
20-2			Colonias líquidas blancas brillantes circulares con borde regular
20-3			Colonias cremosas blancas con borde regular
21-3			Colonias amarillas cremosas umbonadas irregulares brillantes
7-4			Colonias amarillas pulvinadas cremosas brillantes irregulares
14-5			Colonias convexas circulares amarillas brillantes
19-3			Colonias blancas opacas umbonadas circulares borde regular rizadas

Código aislado	Placa	Colonia vista al Estereoscopio	Descripción
4-3			Colonias blancas cremosas brillantes circular borde regular pulvinada
2-4			Colonias convexas entero color blanco intenso en el centro brillantes
29-4B			Colonias irregulares cremosas borde entero brillante
9-4			Colonias planas circulares color amarillo borde entero brillantes
16-4			Colonia convexa blanca cremosa brillante fusiforme
18-4B			Colonias convexa blanca cremosa brillante borde entero
22-4			Colonias traslucidas planas fusiformes borde entero

Código aislado	Placa	Colonia vista al Estereoscopio	Descripción
21-4			Colonias planas blancas en centro rugosas opacas rizadas
16-3			Colonia umbonada circulares ovaladas café claras opacas rugosas
2-3			Colonias café claro planas lisas circular borde regular cremosas brillantes

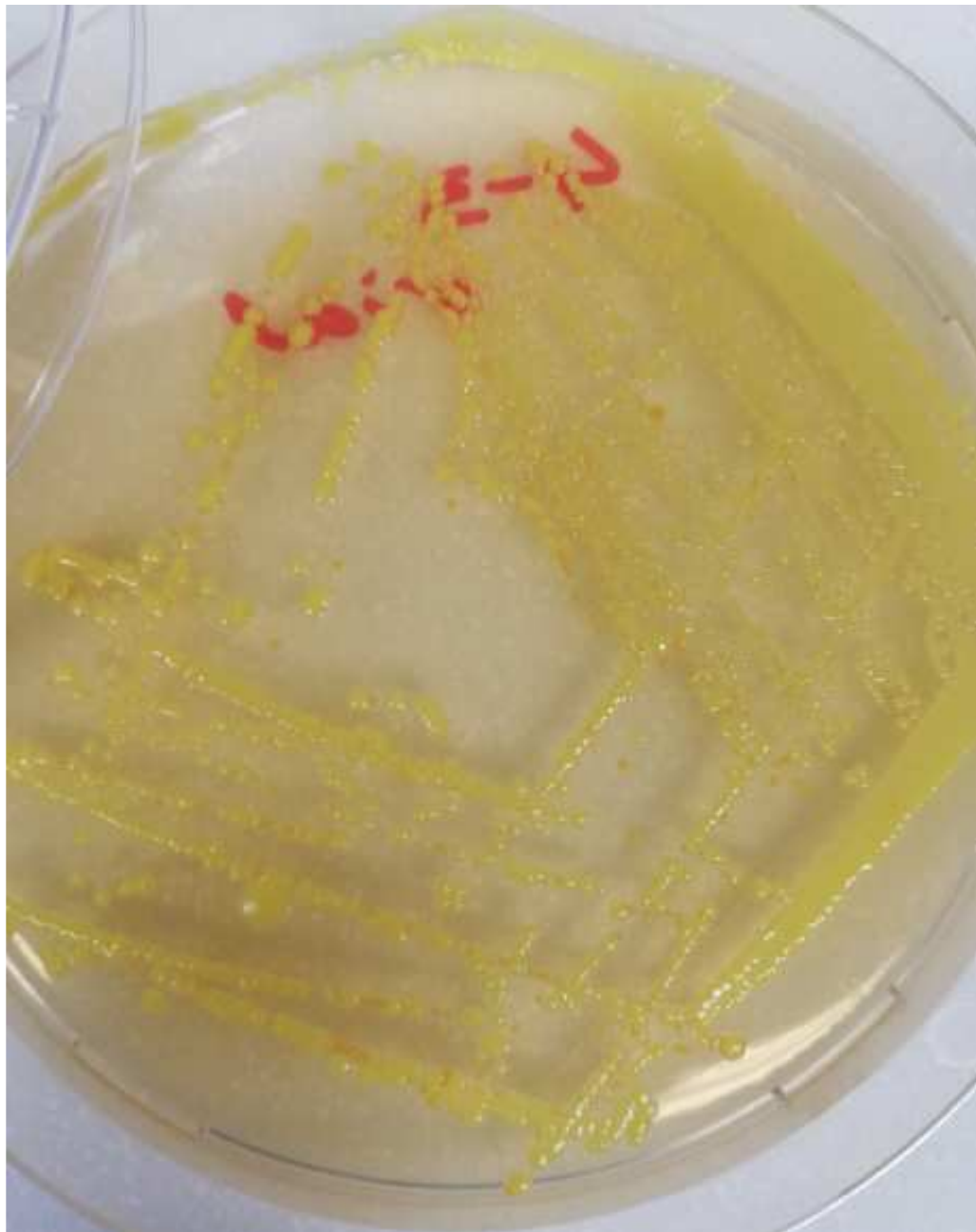


Figura S3. Rayado en placa de la bacteria nativa *Dermacoccus* sp.

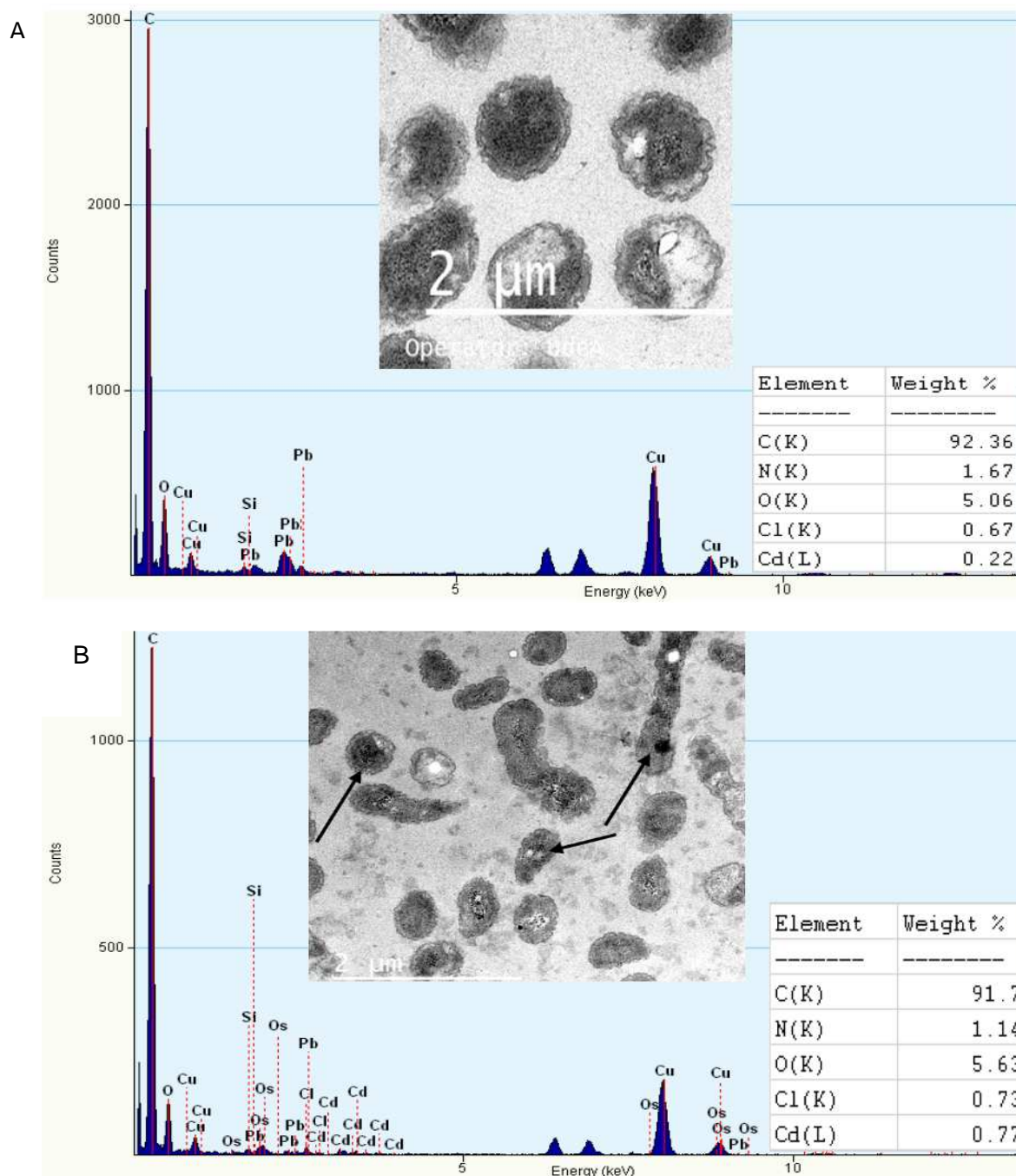


Figura S4. Imágenes TEM y EDX para la bacteria de referencia *Cupriavidus metallidurans* DSM 2839 (Fig. 3i-j). A: 0 mg/L Cd; B: 15 mg/L Cd. Flechas señalan gránulos de Cd en citoplasma. Picos Pb-Cu provienen de tintas de contraste.

Tabla S1. Composición de los medios de cultivo empleados.

		g/L
Agar R2A (bajo en concentración de nutrientes)	Extracto de levadura	0.5
	Proteosa peptona N° 3	0.5
	Peptona ácida de caseína	0.5
	Glucosa	0.5
	Almidón soluble	0.5
	Piruvato de sodio	0.3
	Fosfato dipotásico	0.3
	Sulfato de magnesio	0.05
	Agar-agar	15
		g/L
Agar Nutritivo (Alto en concentración de nutrientes)	Peptona de carne	10
	Extracto de carne	10
	Cloruro de sodio	5.0
	Agar-agar	18

Tabla S3. Propiedades de suelos de las fincas cacaoteras. Textura; pH; Capacidad intercambio catiónico efectiva (C.I.C.E); Carbono (C); Materia orgánica (MO), Fosforo (P), Azufre (S), Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Potasio (K), Sodio (Na), Conductividad eléctrica (C.E), hierro (Fe), Cobre (Cu), Manganeso (Mn), Zinc (Zn), Boro (B), Aluminio (Al), Cadmio total (TCd).

Finca	Textura ‡ (Bouyoucos)	pH	C.I.C.E (Me/100g)	C (%)	MO (%)	P (ppm)	S (ppm)	Ca (Meq/100g)	Mg (Meq/100g)	K (Meq/100g)	Na (Meq/100g)	C.E. (dS/m)	Fe (ppm)	Cu (ppm)	Mn (ppm)	Zn (ppm)	B (ppm)	Al (Meq/100g)	TCd (ppm)
Y1	FArA	4.87	10.90	0.48	0.83	3.11	25	2.11	0.64	0.08	0.14	0.16	160	1.64	2.73	1.22	0.13	1.75	0.21
Y2	FArA	5.20	11.74	0.47	0.81	5.63	12	2.67	0.78	0.07	0.09	0.14	130	1.26	2.34	1.34	0.24	0.54	0.18
Y3	FArA	5.04	14.60	0.48	0.83	5.37	16	2.48	0.62	0.08	0.15	0.24	260	1.21	1.95	1.18	0.18	0.27	0.23
LM1	FAr	5.65	17.20	1.79	3.09	134	6.22	16.24	0.62	0.25	0.11	0.28	74	4.56	23	3.38	0.17	1.23	0.21
LM2	FAr	6.54	26.60	2.87	4.95	77	7	94	4.17	1.09	0.75	0.19	62	4.27	44	7.31	0.34	1.34	0.37
LM3	FAr	5.91	18.81	2.69	4.64	83	12	17.8	0.66	0.24	0.17	0.22	142	4.12	48	6	0.05	0.82	0.11
LA1	FArA	4.95	15.12	1.23	2.12	3.97	15	10	2.14	0.15	0.21	0.11	61	3.67	27	7	0.07	2.68	7.12
LA2	FArA	4.83	10.24	1.49	2.57	3.85	7	6.85	0.78	0.18	0.29	0.14	96	3.89	23	4.9	0.06	2.21	6.45
LA3	FArA	5.18	12.35	1.97	3.40	3.92	7	10	1.57	0.16	0.27	0.12	53	4.72	46	8.9	0.06	0.37	6.81
SV1	FAr	7.16	41.48	3.57	6.15	28	9.51	40.13	0.92	0.25	0.25	0.14	42	2.76	42	91	0.11	3.75	22
SV2	FAr	7.11	41.16	3.22	5.55	11	6.42	40	0.73	0.27	0.28	0.17	14	2	48	60	0.06	5.54	18
SV3	FAr	5.73	26.37	2.14	3.69	6.50	6.49	25	0.99	0.23	0.21	0.14	150	3.46	21	39	0.06	2.63	15

‡ FAr: Franco-arcilloso; FArA: Franco-arcilloso-arenoso, todos los suelos se clasificaron como inceptisol.

Tabla S4. Matriz de correlación entre las propiedades de suelo fincas cacaoteras seleccionadas.

	Arena	Arcilla	Limo	pH	C.I.C.E	C	MO	P	S	Ca	Mg	K	Na	C.E.	Fe	Cu	Mn	Zn	B	Al	Cd
Arena	1	-0.72**	-0.639*	-0.693*	-0.604*	-0.628*	-0.628	-0.584	0.36	-0.61*	-0.148	-0.507	-0.384	-0.59*	-0.042	-0.144	-0.438	-0.322	-0.241	-0.145	-0.113
Arcilla	-0.728**	1	-0.062	0.647*	0.623*	0.515	0.515	0.431	-0.519	0.338	-0.175	0.166	0.027	0.51	0.004	-0.003	0.216	0.548	0.156	0.159	0.362
Limo	-0.639**	-0.062	1	0.283	0.18	0.336	0.336	0.367	0.058	0.509	0.412	0.551	0.528	0.287	0.056	0.214	0.395	-0.147	0.176	0.033	-0.242
pH	-0.693*	0.647*	0.283	1	0.954**	0.891**	0.891**	0.302	-0.468	0.737**	0.192	0.456	0.403	0.107	-0.537	0.047	0.668*	0.797**	0.106	0.628*	0.613*
C.I.C.E	-0.604*	0.623*	0.18	0.954**	1	0.836**	0.836**	0.098	-0.41	0.634*	0.099	0.306	0.289	-0.022	-0.489	-0.061	0.573	0.906**	-0.045	0.775**	0.784**
C	-0.628*	0.515	0.336	0.891**	0.836**	1	0.99**	0.342	-0.623*	0.703*	0.257	0.482	0.458	-0.005	-0.654*	0.435	0.893**	0.722**	-0.129	0.569	0.632*
MO	-0.628*	0.515	0.336	0.891**	0.836**	0.99**	1	0.343	-0.624*	0.703*	0.257	0.482	0.459	-0.004	-0.654*	0.435	0.893**	0.721**	-0.128	0.569	0.631*
P	-0.584*	0.431	0.367	0.302	0.098	0.342	0.343	1	-0.315	0.369	0.165	0.462	0.263	0.755**	-0.174	0.527	0.309	-0.141	0.365	-0.204	-0.339
S	0.36	-0.519	0.058	-0.468	-0.41	-0.623*	-0.624	-0.315	1	-0.442	-0.206	-0.365	-0.344	-0.034	0.542	-0.564	-0.588*	-0.323	0.036	-0.236	-0.389
Ca	-0.61*	0.338	0.509	0.737**	0.634*	0.703*	0.703*	0.369	-0.442	1	0.757**	0.927**	0.908**	0.076	-0.461	0.292	0.585*	0.352	0.539	0.304	0.219
Mg	-0.148	-0.175	0.412	0.192	0.099	0.257	0.257	0.165	-0.206	0.757**	1	0.866**	0.928**	-0.173	-0.346	0.409	0.365	-0.134	0.594*	-0.081	-0.136
K	-0.507	0.166	0.551	0.456	0.306	0.482	0.482	0.462	-0.365	0.927**	0.866**	1	0.971**	0.158	-0.31	0.422	0.448	0.002	0.682*	-0.010	-0.112
Na	-0.384	0.027	0.528	0.403	0.289	0.458	0.459	0.263	-0.344	0.908**	0.928**	0.971**	1	-0.040	-0.345	0.402	0.47	0.016	0.60*	0.043	-0.036
C.E.	-0.59*	0.510	0.287	0.107	-0.022	-0.005	-0.004	0.755**	-0.034	0.076	-0.173	0.158	-0.040	1	0.34	0.050	-0.089	-0.257	0.368	-0.296	-0.464
Fe	-0.042	0.004	0.056	-0.537	-0.489	-0.211*	-0.654*	-0.174	0.542	-0.461	-0.346	-0.31	-0.345	0.34	1	-0.467	-0.71**	-0.455	0.126	-0.57	-0.499
Cu	-0.144	-0.003	0.214	0.047	-0.061	0.435	0.435	0.527	-0.564	0.292	0.409	0.422	0.402	0.050	-0.467	1	0.625*	-0.131	-0.118	-0.138	-0.038
Mn	-0.438	0.216	0.395	0.668*	0.573*	0.893**	0.893**	0.309	-0.588*	0.585*	0.365	0.448	0.47	-0.089	-0.715**	0.625*	1	0.447	-0.216	0.380	0.431
Zn	-0.322	0.548	-0.147	0.797**	0.906**	0.722**	0.721**	-0.141	-0.323	0.352	-0.134	0.002	0.016	-0.257	-0.455	-0.131	0.447	1	-0.294	0.778**	0.932**
B	-0.241	0.156	0.176	0.106	-0.045	-0.129	-0.128	0.365	0.039	0.539	0.594*	0.682*	0.60*	0.368	0.126	-0.118	-0.216	-0.294	1	-0.369	-0.491
Al	-0.145	0.159	0.033	0.628*	0.775**	0.569	0.569	-0.204	-0.236	0.304	-0.081	-0.012	0.043	-0.296	-0.57	-0.138	0.38	0.778**	-0.369	1	0.824**
Cd	-0.113	0.362	-0.242	0.613*	0.784**	0.632*	0.631*	-0.204	-0.389	0.219	-0.136	-0.112	-0.036	-0.464	-0.499	-0.038	0.431	0.932**	-0.491	0.824**	1

PROTOCOLO DE MUESTREO FINCAS CACAOTERAS

UTENCILIOS A EMPLEAR

Mapa o croquis del predio, Machete, Barreno, azadón, Cuchillo, Balde plástico limpio, solución de hipoclorito al 1%, guantes, marcadores, GPS, formatos para diligenciar lista de chequeo, Material de empaque para muestras, nevera de icopor, hielo seco, tamices 2mm. y 4 mm.

FINCAS A MUESTREAR.

Yariguies (Y), Siempre Viva (SV), La Argentina (LA) y Los Medios (LM) del Municipio San Vicente de Chucuri. En entrevista con el propietario o encargado de la finca, recolectar información como plano general de la finca, plano lote de interés y diligenciar tabla 1 (información que se mantendrá confidencial). El protocolo de muestreo se socializará a los operarios y propietarios antes de realizar el muestreo.

MUESTREO SUELO (Guía de muestreo Suelos UNALMED e IGAC, NTC 4113-6)

- El tipo de muestreo propuesto es en forma de zig-zag (figura 1 numeral 1)



Figura S5. Resumen muestreo suelos (Fuente: Pinterest).

- Lote a muestrear de acuerdo con el documento previamente enviado.
- Desinfectar las herramientas antes de usarlas.
- Usar guantes en todo momento del muestreo y cambiarlos entre muestra y muestra.

- Identificar si el lote tiene características homogéneas, de lo contrario se definirá si dividimos el lote en dos y en cada lote muestrear aleatoriamente un n=18 muestras.
- En cada punto de muestreo remover las plantas y hojarasca fresca de un área de 40cmx40cm mediante azadón.
- La muestra se tomará a la mitad de la proyección de la copa del árbol de cacao (ver figura 2).
- Se tomarán las coordenadas geográficas del punto muestreado.
- Se marcará el árbol muestreado con cinta o distintivo fácilmente identificable.

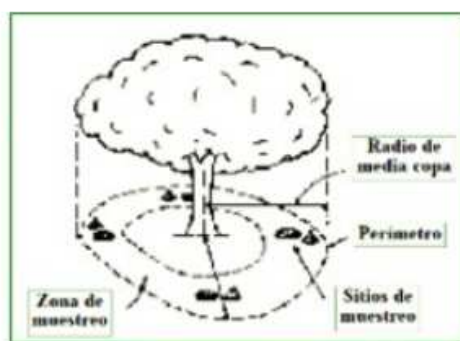



Figura S6. Sitio muestreo árbol cacao (Fuente: <https://es.scribd.com/document/438067269/Cacao>)

- Para la toma de muestras con barreno, se abrirá un hoyo de aproximadamente 25 x 25 cm de lado y 20 cm de profundidad, retire los primeros 2 cm del suelo y extraiga la muestra.
- Se mezclará en un balde o lona las sub-muestras hasta obtener una muestra compuesta homogénea.
- Se tamizará la muestra en malla 2 mm o malla 4 mm dependiendo de contenido de humedad, esto con la finalidad de eliminar piedras, raíces y solo quede el suelo.
- Se empacará aproximadamente 3 kg en bolsas plásticas estériles.
- Colocar las bolsas de suelo en la nevera de icopor con hielo seco para su transporte.


**GENERALIDADES PARA TOMA DE MUESTRAS
PARA ANÁLISIS DE TEJIDO VEGETAL (HOJAS Y MAZORCAS).**

- Se muestrearán los árboles que correspondan a los puntos de sub-muestreo.
- Se seleccionará la segunda y tercera hoja completamente verde más próxima a los retoños y se recolectarán 2 a 3 hojas por árbol, del lado este, norte, oeste y sur.
- Se tomará un total de hojas por lote muestreado de 20 a 25.
- Se tomará 2 mazorcas por árbol muestreado,
- Introduzca el material vegetal en una bolsa plástica estéril.
- Se identificará la bolsa con los datos de la finca en particular.
- Se enviará lo más pronto posible al laboratorio Agrilab.



CERTIFICADO DE ANALISIS
FERTILIDAD DEL SUELO

Propietario: Sr(a) BERNARDO PICO



Remitente: **COMPANIA NACIONAL DE CHOCOLATES S.A.S**

Número de Certificado:	ASU 167592	Fecha Ingreso	13/06/2017
Cultivo / Variedad	CACAO / NO ESPECIFICADO	Fecha Emisión	30/06/2017
Municipio / Departamento / Finca	SANTANDER / SAN VICENTE DE CHUCURI / EL LLANITO		
Identificación	VDA. SANTA INES		

Parámetro	Valor	Calificación	Extracción / Método analítico / Referencia
pH	7,27	A	Pasta Saturación/Potenciométrico/Método Interno
C.E (dS/m)	0,33	D	Extracto Saturación/Conductímetro/Método Interno
%Carbono Orgánico	1,65	B	Walkley-Black / Colorimétrico / Método Interno
%Materia Orgánica	2,84	B	Cálculo
Textura	FRANCO-ARCILLOSO		Boyocuos
	% Arena 42	% Limo 25	% Arcilla 32

Parámetro	meq/100g	mg/kg (p.p.m)	Calificación	Extracción / Método analítico / Referencia
Potasio intercambiable	0,18	70,2	B	Ac. NH ₄ / Absorción Atómica / Método Interno
Calcio intercambiable	22,0	4400	E	Ac. NH ₄ / Absorción Atómica / Método Interno
Magnesio intercambiable	0,97	116	B	Ac. NH ₄ / Absorción Atómica / Método Interno
Sodio intercambiable	0,17	39,1	M	Ac. NH ₄ / Absorción Atómica / Método Interno
Acidez intercambiable	N.A	N.A	N.A	KCl / Volumetría / Método Interno
Hierro		24,0	M	Mezcla ácida / Absorción Atómica / Methich I
Manganeso		63	A	Mezcla ácida / Absorción Atómica / Methich I
Cobre		0,85	B	Mezcla ácida / Absorción Atómica / Methich I
Zinc		7,3	A	Mezcla ácida / Absorción Atómica / Methich I
Boro		0,05	D	Ca(OH)PO ₄ / Colorimétrico / Método Interno
Fósforo		24	M	Sin. Bray II / Colorimétrico / Método Interno
Azufre		14	B	Ca(OH)PO ₄ / Turbidimétrico / Método Interno

Este documento registra fielmente el resultado de las mediciones realizadas. Los resultados contenidos en el presente, hacen referencia a la(s) muestra(s) analizadas en las fechas indicadas. El laboratorio no presta el servicio de muestreo en campo, en consecuencia no se responsabiliza de los perjuicios derivados de dicho proceso, así como de errores en la interpretación de los resultados. La fecha de ejecución de los ensayos, corresponde al periodo comprendido entre la fecha de ingreso y la fecha de emisión. Los valores de referencia están tomados de bases de datos internas de Agrilab S.A.S. y de las referencias: "Fertilización de cultivos en clima frío (1998). Fertilización de cultivos en clima medio (1995) y Fertilización de cultivos en clima cálido, editados por Guerrero R. y publicados por Monómeros Colombo Venezolanos S.A."

Cálculos		Claves
Magnesio	4,16	Calificación según cultivo: D: Deficiente B: Bajo M: Medio A: Alto E: Excesivo Referente al servicio solicitado: M.I: Muestra insuficiente N.A: No Analizado Referente al informe: Fecha de ingreso se refiere a la fecha en que el laboratorio codifica la muestra. Todos los valores con calificación E han sido verificados
Sodio	0,73	
Aluminio	N.A	
Potasio	0,77	
Calcio	94,3	
C.I.C.E. (meq/100g)	23,3	
Relaciones		
Ca/Mg	22,7	
Ca/K	122	
Mg/K	5,39	
(Ca+Mg)/K	128	

El presente certificado no puede ser reproducido parcial o totalmente, salvo autorización expresa por parte del laboratorio AGRILAB S.A.S.

Myriam Bendeck Lugo
MYRIAM BENDECK LUGO
 Química Director Técnico PQ-1168

Página 1 de 1 - Fin del informe

Adriana Navarro Urdaneta
ADRIANA NAVARRO URDANETA
 Lic. Química Coordinadora de Área

CIENCIA Y TECNOLOGÍA AL SERVICIO DEL SECTOR AGRÍCOLA

Calle 79 B No. 70 - 16 Bogotá, D.C. PBX: 223 1999 - Fax: 223 4087
 Para quejas y reclamos comuníquese al E-mail: servicioalcliente@agrilab.com.co
www.agrilab.com.co

Recibido por e-mail
30 JUN 2017

Figura S7. Informes de algunos resultados análisis de suelo.



**CERTIFICADO DE ANALISIS
FERTILIDAD DEL SUELO**



Propietario: Sr(a) SIERVO SANCHEZ

Remitente: COMPANIA NACIONAL DE CHOCOLATES S.A.S				
Número de Certificado:	ASU 167593		Fecha Ingreso	
Cultivo / Variedad	CA CAO / NO ESPECIFICADO		13/06/2017	
Municipio /Departamento / Finca	SANTANDER / SAN VICENTE DE CHUCURI / MIRAFLORES		Fecha Emisión	
Identificación	VDA. EL CENTRO		30/06/2017	
Parámetro	Valor	Calificación	Extracción / Método analítico / Referencia	
pH	4,57	B	Pasta Saturación/Potenciométrico/Método Interno	
C.E (dS/m)	0,16	D	Extracto Saturación/Conductímetro/Método Interno	
%Carbono Orgánico	0,99	D	Walkley-Black / Colorimétrico / Método Interno	
%Materia Orgánica	1,71	D	Cálculo	
Textura	FRANCO-ARCILLO-ARENOSO			
	% Arena	% Limo	% Arcilla	
	60	20	20	
Resultados Obtenidos				
Parámetro	meq/100g	mg/Kg (p.p.m)	Calificación	Extracción / Método analítico / Referencia
Potasio intercambiable	0,46	179	M	Ac. NH ₄ / Absorción Atómica / Método Interno
Calcio intercambiable	4,75	950	M	Ac. NH ₄ / Absorción Atómica / Método Interno
Magnesio intercambiable	0,54	64,8	D	Ac. NH ₄ / Absorción Atómica / Método Interno
Sodio intercambiable	0,13	29,9	M	Ac. NH ₄ / Absorción Atómica / Método Interno
Acidez intercambiable	2,56	230	E	KCl / Volumetría / Método Interno
Hierro		523,0	E	Mezcla ácida / Absorción Atómica / Mellich i
Manganeso		16	M	Mezcla ácida / Absorción Atómica / Mellich i
Cobre		3	A	Mezcla ácida / Absorción Atómica / Mellich i
Zinc		2,4	M	Mezcla ácida / Absorción Atómica / Mellich i
Boro		0,05	D	Ca(OH)PO ₄ / Colorimétrico / Método Interno
Fósforo		8,1	B	Slr. Bray II / Colorimétrico / Método Interno
Azufre		10	B	Ca(OH)PO ₄ / Turbidimétrico / Método Interno

Este documento registra fielmente el resultado de las mediciones realizadas. Los resultados contenidos en el presente, hacen referencia a la(s) muestra(s) analizadas en las fechas indicadas. El laboratorio no presta el servicio de muestreo en campo, en consecuencia no se responsabiliza de los perjuicios derivados de dicho proceso, así como de errores en la interpretación de los resultados. La fecha de ejecución de los ensayos, corresponde al periodo comprendido entre la fecha de ingreso y la fecha de emisión. Los valores de referencia están tomados de bases de datos internas de Agrilab S.A.S. y de las referencias: "Fertilización de cultivos en clima frío (1998), Fertilización de cultivos en clima medio (1995) y Fertilización de cultivos en clima cálido, editados por Guerrero R. y publicados por Monómeros Colombo Venezolanos S.A."

Cálculos			Claves
%Saturación	Magnesio	6,40	Calificación según cultivo: D: Deficiente B: Bajo M: Medio A: Alto E: Excesivo Referente al servicio solicitado: M.I.: Muestra Insuficiente N.A.: No Analizado Referente al informe: Fecha de ingreso se refiere a la fecha en que el laboratorio codifica la muestra. Todos los valores con calificación E han sido verificados
	Sodio	1,54	
	Aluminio	30,3	
	Potasio	5,45	
	Calcio	56,3	
Relaciones	C.I.C.E. (meq/100g)	8,44	
	Ca/Mg	8,80	
	Ca/K	10,3	
	Mg/K	1,17	
	(Ca+Mg)/K	11,5	

El presente certificado no puede ser reproducido parcial o totalmente, salvo autorización expresa por parte del laboratorio AGRILAB S.A.S.

Myriam Benéck Lugo
MYRIAM BENÉCK LUGO
 Química Director Técnico PQ-1168

Página 1 de 1 - Fin del informe

Adriana Navarro Urdaneta
ADRIANA NAVARRO URDANETA
 Lic. Química Coordinadora de Área

CIENCIA Y TECNOLOGÍA AL SERVICIO DEL SECTOR AGRÍCOLA

Calle 79 B No. 70 - 16 Bogotá, D.C. PBX: 223 1999 - Fax: 223 4087

Figura S8. Informes de algunos resultados análisis de suelo.



COMPAÑIA NACIONAL DE CHOCOLATES S.A.S

ANÁLISIS DE MATERIAL FOLIAR

CULTIVO : CACAO - DEPARTAMENTO: SANTANDER

Remitente: COMPAÑIA NACIONAL DE CHOCOLATES S.A.S/ Ing. PEDRO FELIPE FERIA - Fecha de Recepción : 23 de Junio de 2017

No. Laboratorio	Identificación		Municipio	Finca	Cd p.p.m.
	Lote	Parte			
102940	Vda. El Centro	Cáscara	SAN VICENTE DE CHUCURI	GRANJA MIRA FLORES	0,33
		Pulpa			0,24
102941	Vda. El Pertrecho	Cáscara	SAN VICENTE DE CHUCURI	GRANJA AGUA DULCE	1,72
		Pulpa			1,12
102942	Vda. Santa Ines	Cáscara	SAN VICENTE DE CHUCURI	GRANJA EL LLANITO	3,10
		Pulpa			2,48
102943	Vda. Alto Viento	Cáscara	SAN VICENTE DE CHUCURI	GRANJA SAN JOSE	6,65
		Pulpa			5,30

ATENTAMENTE,

Bogotá, julio 12 de 2017

Página 1 de 1

Myriam Bendeck Lugo
 MYRIAM BENDECK LUGO
 Química Director Técnico PQ-1168

CIENCIA Y TECNOLOGÍA AL SERVICIO DEL SECTOR AGRÍCOLA

Andrés Moreno O.
 ALVARO ANDRÉS MORENO OSPINA
 Químico Coordinador de Área, PQ-5067

Calle 79 B No. 70 - 16 Bogotá, D.C. PBX: 223 1999 - Fax: 223 4087
 Para quejas y reclamos comuníquese al E-mail: servicioalcliente@agrilab.com.co
 www.agrilab.com.co

Enviado por e-mail
 12 JUL 2017

Figura S9. Informes de algunos resultados análisis de material vegetal.

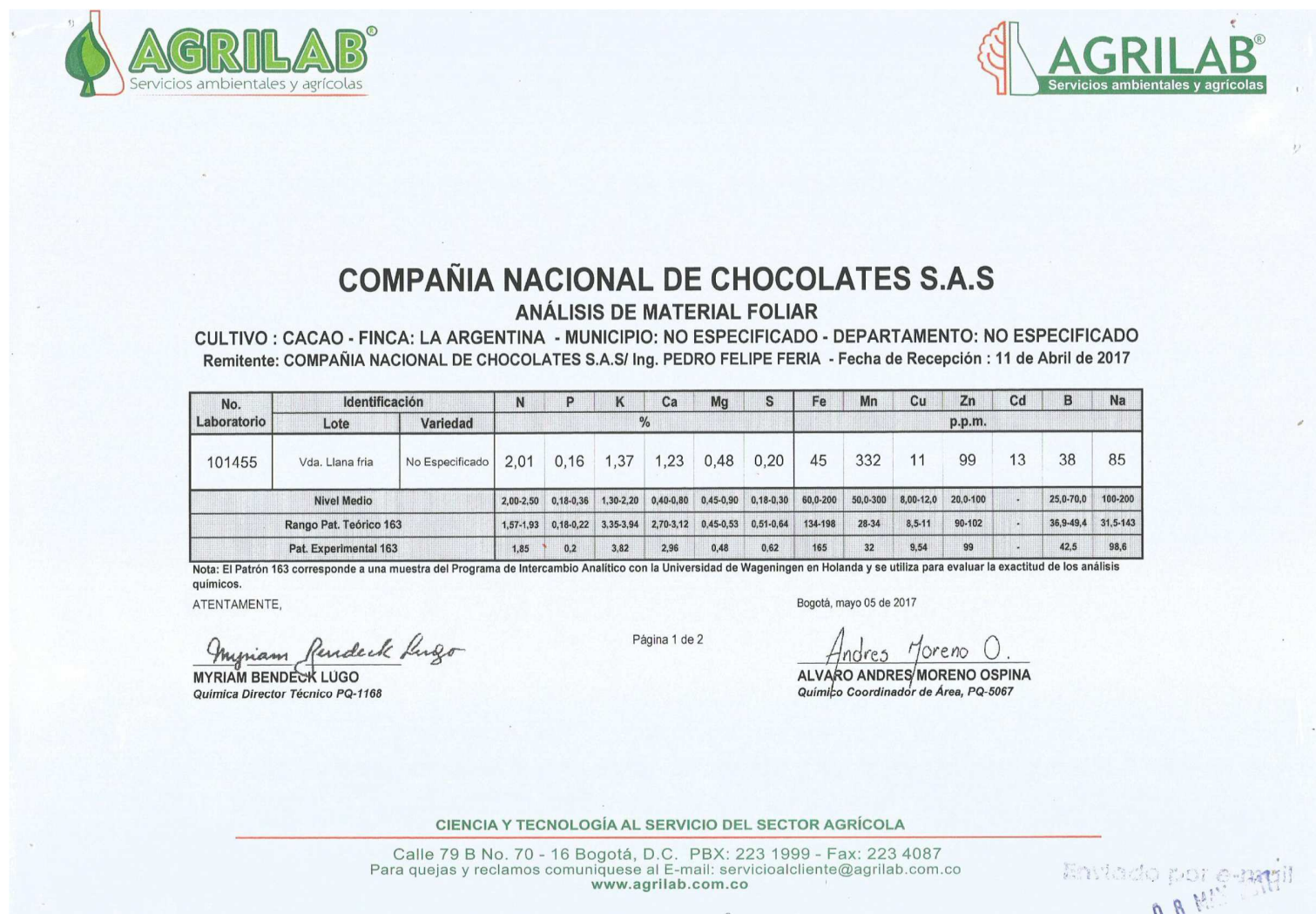


Figura S10. Informes de algunos resultados análisis de material vegetal.