



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**CARACTERIZACIÓN DE MICROBIOMAS BACTERIANOS
PRESENTES EN SUELOS CACAOTEROS CON ALTA Y
BAJA CONCENTRACIÓN DE CADMIO DEL MUNICIPIO
DE YACOPÍ - CUNDINAMARCA**

Wendy Lorena Ríos Guzmán

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSGRADO EN CIENCIAS-MICROBIOLOGÍA
BOGOTÁ, COLOMBIA**

Enero 2023

**CARACTERIZACIÓN DE MICROBIOMAS BACTERIANOS
PRESENTES EN SUELOS CACAOTEROS CON ALTA Y
BAJA CONCENTRACIÓN DE CADMIO DEL MUNICIPIO
DE YACOPÍ - CUNDINAMARCA**

Wendy Lorena Ríos Guzmán

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Ciencias- Microbiología

Directora

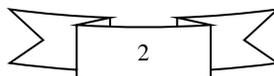
Ph.D., Esperanza Torres Rojas

Codirector

Ph.D., Emiliano Barreto Hernández

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSGRADO EN CIENCIAS-MICROBIOLOGÍA
BOGOTÁ, COLOMBIA**

Enero 2023



AGRADECIMIENTOS

La autora expresa sus agradecimientos:

A los docentes, Esperanza Torres Rojas y Emiliano Barreto Hernández por su guía, dedicación, tiempo, sabiduría, apoyo incondicional y confianza.

A la División de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia por financiar el proyecto de investigación (Proyecto Hermes: 42156).

A los agricultores del municipio de Yacopí Cundinamarca por su amabilidad al permitir el acceso a la zona de muestreo.

A los docentes, Michael Gribskov y Andrés Mauricio Pinzón por su apoyo en el análisis bioinformático y por suministrar cortésmente el servidor.

Al Grupo de Agrobiotecnología y Agrobiodiversidad de la Universidad Nacional de Colombia, en especial, a Camilo Bustos Linares por el apoyo brindado durante el desarrollo de la investigación.

A mis padres y a mi hija Camila Bermúdez Rios por su amor incondicional y su paciente espera.

RESUMEN

CARACTERIZACIÓN DE MICROBIOMAS BACTERIANOS PRESENTES EN SUELOS CACAOTEROS CON ALTA Y BAJA CONCENTRACIÓN DE CADMIO DEL MUNICIPIO DE YACOPÍ- CUNDINAMARCA

El cadmio (Cd) es un metal pesado altamente tóxico presente en el suelo que puede alterar la comunidad microbiana y las plantas que habitan en él. En América Latina, se han reportado altas concentraciones de este elemento en los suelos y granos de cacao, lo que representa una gran preocupación debido al impacto potencial en la salud humana, la seguridad alimentaria y la economía del cacao. Entre las estrategias para mitigar la absorción de Cd por parte de la planta se encuentra el uso de bacterias nativas tolerantes al Cd. Sin embargo, se desconoce el efecto que pueda causar el Cd en los microbiomas bacterianos. Con el objetivo de estudiar el efecto del Cd en la estructura y función de las comunidades bacterianas presentes en los suelos cacaoteros, se muestrearon tres fincas productoras de cacao en el municipio de Yacopí-Cundinamarca (F1, F2 y F3). En cada finca, se seleccionaron dos lotes de muestreo, uno con cultivo de cacao (SCC) y otro sin cultivo de cacao (SWC). En cada lote, se seleccionaron tres puntos de muestreo y para cada punto se recolectó suelo rizosférico (RZ, solo para SCC, y suelo a dos profundidades diferentes (D1: 0-30 cm; D2: 31-100 cm). En total se recolectaron 36 muestras de suelo, de las cuales 24 correspondieron a SCC y 12 a SWC. Todas las muestras se sometieron a análisis fisicoquímicos (textura, pH, Cd total, Cd disponible, Ca, Mg, K, CICE, P, Fe, Cu, Mn, Zn, CO). Las concentraciones de Cd total y disponible variaron entre lotes, fincas y nivel de profundidad. Se encontró una concentración significativamente más alta de Cd total en las muestras de suelo RZ, y los niveles promedio de Cd en las fincas fueron: $F1 > F3 > F2$. La extracción del ADN comunitario se realizó con el kit DNeasy® PowerSoil®; la amplificación y secuenciación de la hipervariable 4 del gen 16S RNAr se realizó mediante PCR de punto final y la plataforma Illumina MiSeq respectivamente. Las curvas de rarefacción indicaron que la mayoría de las muestras fueron secuenciadas con suficiente profundidad y los índices de diversidad alfa evaluados (Chao1, Shannon y Gini-Simpson) reflejaron comunidades altamente diversas con valores promedio de 973, 5.9 y 0.98 respectivamente. El Análisis de Componentes Principales (PCoA) basado en la métrica Unifrac ponderado reveló que las comunidades de F1 son significativamente diferentes a F2 y F3, y hay mayor similitud entre F2 y F3. A nivel taxonómico se identificaron 39 filos bacterianos, donde los más abundantes correspondieron a: Proteobacteria (36,5%), Acidobacteria (15,0%), Firmicutes (9,8%), Planctomycetes (8,6%), Verrucomicrobia (6,0%), Chloroflexi (6,0%) y Nitrospirae (5,1%). A nivel de género se identificaron 122, entre los que se destacaron *Bradyrhizobium* (13,0%), *Bacillus* (8,8%), *DA101* (4,5%), *Nitrososphaera* (1,8%) y *Nitrospira* (1,2%), algunos de los cuales se han relacionado con procesos de tolerancia a Cd. Por otra parte, las vías funcionales identificadas con mayor abundancia

relativa estaban involucradas con la tolerancia al Cd. Esta investigación proporciona información valiosa sobre la comunidad bacteriana presente en el cultivo del cacao y su posible papel en la bioacumulación de Cd presente en el suelo.

Palabras claves: metal pesado, cacao, diversidad, comunidad bacteriana, metagenómica.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF BACTERIAL MICROBIOMES PRESENT IN CACAO SOILS WITH HIGH AND LOW CADMIUM CONCENTRATION IN THE MUNICIPALITY OF YACOPI – CUNDINAMARCA

Cadmium (Cd) is a highly toxic heavy metal present in soil that can alter the microbial community and the plants that inhabit it. In Latin America, high concentrations of this element have been reported in cacao soils and beans, which is of great concern due to the potential impact on human health, food safety and the cocoa economy. Strategies to mitigate Cd uptake by the plant include the use of native Cd-tolerant bacteria. However, the effect of Cd on bacterial microbiomes is unknown. In order to study the effect of Cd on the structure and function of bacterial communities present in cocoa soils, three cocoa farms in the municipality of Yacopí-Cundinamarca (F1, F2 and F3) were sampled. On each farm, two sampling plots were selected, one with cocoa cultivation (SCC) and one without cocoa cultivation (SWC). In each lot, three sampling points were selected and for each point rhizospheric soil (RZ, only for SCC, and soil at two different depths (D1: 0-30 cm; D2: 31-100 cm) were collected. A total of 36 soil samples were collected, of which 24 corresponded to SCC and 12 to SWC. All samples were subjected to physicochemical analysis (texture, pH, total Cd, available Cd, Ca, Mg, K, ECEC, P, Fe, Cu, Mn, Zn, CO). Total and available Cd concentrations varied among plots, farms and depth level. A significantly higher concentration of total Cd was found in the RZ soil samples, and the average Cd levels in the farms were: F1 > F3 > F2. Community DNA extraction was performed using the DNeasy® PowerSoil® kit; amplification and sequencing of the 16S rRNA gene hypervariable 4 was performed using endpoint PCR and the Illumina MiSeq platform respectively. Rarefaction curves indicated that most samples were sequenced with sufficient depth and the alpha diversity indices evaluated (Chao1, Shannon and Gini-Simpson) reflected highly diverse communities with mean values of 973, 5.9, and 0.98 respectively. Principal Component Analysis (PCoA) based on the weighted Unifrac metric revealed that F1 communities are significantly different from F2 and F3, and there is greater similarity between F2 and F3. At the taxonomic level, 39 bacterial phyla were identified, where the most abundant corresponded to: Proteobacteria (36.5%), Acidobacteria (15.0%), Firmicutes (9.8%), Planctomycetes (8.6%), Verrucomicrobia (6.0), Chloroflexi (6.0%) and Nitrospirae (5.1%). At the genus level, 122 were identified, among which *Bradyrhizobium* (13.0%), *Bacillus* (8.8%), *DA101* (4.5%), *Nitrososphaera* (1.8%) and *Nitrospira* (1.2%), some of which have been related to Cd tolerance processes. On the other hand, the functional pathways identified with higher relative abundance were involved with Cd tolerance. This research provides valuable information on the bacterial community present in the cocoa crop and its possible role in the bioaccumulation of Cd present in the soil.

Keywords: heavy metal, cacao, diversity, bacterial community, metagenomics.

CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE TABLAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE ANEXOS.....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	14
2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	17
3. HIPÓTESIS.....	18
4. OBJETIVOS.....	19
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	19
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
5. MARCO TEÓRICO.....	20
5.1 SUELOS AGRÍCOLAS Y EL CULTIVO DE CACAO.....	20
5.1.1 Definición de suelo.....	20
5.1.2 Propiedades físicas y químicas del suelo.....	21
5.1.3 Suelos contaminados con metales pesados.....	23
5.1.4 Cultivo de cacao.....	28
5.2 COMUNIDAD BACTERIANA DEL SUELO.....	32
5.2.1 Función de la comunidad bacteriana en el suelo.....	32
5.2.2 Mecanismos de tolerancia al Cd presente en las bacterias.....	35
5.3 METODOLOGÍAS PARA ESTUDIAR LA COMUNIDAD BACTERIANA.....	39
5.3.1 Métodos dependientes de cultivo.....	39
5.3.2 Métodos independientes de cultivo: Metagenómica.....	40
5.3.3 Procesamiento de datos de secuenciación de amplicón.....	41
5.3.4 Análisis de diversidad, abundancia y predicción funcional.....	43
5.4 ESTUDIOS METAGENÓMICOS EN SUELOS CACAOTEROS CON Cd.....	46
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
6.1 Descripción del sitio y diseño del muestreo.....	49
6.2 Análisis fisicoquímico de las muestras de suelo y determinación de Cdt y Cda...	51
6.3 Extracción de ADN de suelos.....	51
6.4 Amplificación y preparación de librerías metagenómicas.....	51

6.5	Procesamiento y análisis de secuencias	52
6.6	Análisis estadístico	53
7.	RESULTADOS.....	54
7.1	Análisis fisicoquímico de los suelos y concentración de Cdt y Cda.	54
7.2	Correlación entre las propiedades fisicoquímicas del suelo, el Cdt y el Cda.	56
7.3	Datos de secuenciación y diversidad bacteriana en los suelos.	57
7.3.1	Visión general de la secuenciación.....	57
7.3.2	Análisis de diversidad alfa.....	58
7.3.3	Análisis de diversidad beta.	59
7.2.3	Abundancia relativa de ASVs a nivel de filo y género.....	60
7.2.4	Análisis de abundancia diferencial.	62
7.3	Correlación entre las propiedades fisicoquímicas y las comunidades bacterianas.....	63
7.4	Correlación entre las propiedades fisicoquímicas y la abundancia de taxones.	64
7.5	Predicción funcional de las comunidades bacterianas presentes en los suelos.....	66
8.	DISCUSIÓN.....	68
8.1	Análisis fisicoquímico de los suelos y concentración de Cdt y Cda.	68
8.2	Datos de secuenciación y diversidad bacteriana en los suelos.	71
8.3	Correlación entre las propiedades fisicoquímicas y las comunidades bacterianas.....	74
8.4	Predicción funcional de las comunidades bacterianas presentes en los suelos.....	75
9.	CONCLUSIONES.....	78
10.	RECOMENDACIONES.....	80
11.	ANEXOS	81
12.	BIBLIOGRAFÍA.....	88

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Concentración total de algunos metales pesados de interés agrícola.	23
Tabla 2. Concentraciones máximas de Cd permitidas en productos derivados del cacao según la Comisión Europea.	32
Tabla 3. Medidas de diversidad ecológica comúnmente utilizadas en estudios de ecología microbiana.	45

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Perfil de suelo típico.	21
Figura 2. Absorción de cadmio por las raíces en las plantas.	26
Figura 3. Distribución de Cd total en el suelo de fincas cacaoteras en Colombia.	27
Figura 4. Principales países productores de grano de cacao.	30
Figura 5. (a) Distribución por Departamento de las áreas sembradas con cacao en Colombia (b) Producción de cacao por municipio (toneladas/año).	31
Figura 6. Representación esquemática de los mecanismos de tolerancia bacteriana a Cd.	38
Figura 7. Representación esquemática del complejo ribosómico y el gen 16S ARNr y los diversos pares de cebadores utilizados para la secuenciación metagenómica.	41
Figura 8. Flujo de trabajo de los métodos comúnmente utilizados para la secuenciación de amplicón (A) y metagenómica (B).	43
Figura 9. Descripción general del diseño de muestreo del suelo.	50
Figura 10. Concentración de pH, Cdt, Cda, Ca, CICE, P, Mn y Cu con relación a tipo de Finca (F1, F2 y F3), SCC (con cultivo); SWC (sin cultivo) y al tipo de muestra colectada [Rz (suelo rizosférico); D1 (0-30 cm); D2 (31-100 cm)].	56
Figura 11. Correlaciones entre las propiedades fisicoquímicas de los suelos discriminado por finca.	57
Figura 12. Curvas de acumulación de ASVs discriminadas por profundidad (D1: rojo, D2: verde y Rz: azul).	58
Figura 13. Índices de diversidad alfa evaluados a nivel de ASVs (Chao1, Shannon y Gini- Simpson (1-D)).	59
Figura 14. Distancia Unifrac Ponderada a nivel de ASVs.	60
Figura 15. Histograma de la abundancia relativa de los filios bacterianos identificados en los diferentes sitios de muestreo discriminado por finca (F1: Finca 1, F2: Finca 2 y F3: Finca 3) y tipo de muestra colectada (Rz: suelo rizosférico, D1: 0-30 cm y D2: 31-100 cm).	61
Figura 16. Histograma de la abundancia relativa de los géneros bacterianos identificados en los diferentes sitios de muestreo discriminado por finca (F1: Finca 1, F2: Finca 2 y F3: Finca 3) y tipo de muestra colectada (Rz: suelo rizosférico, D1: 0-30 cm y D2: 31-100 cm).	62
Figura 17. Gráfica del análisis discriminante lineal (LDA) muestra la diferenciación en el patrón taxonómico de las muestras a nivel de filo y género.	63
Figura 18. Análisis de redundancia (RDA) de las comunidades bacterianas y las propiedades fisicoquímicas del suelo incluido el Cdt y el Cda.	64
Figura 19. Mapa de calor de agrupamiento que muestra la correlación de Spearman entre la abundancia de los filios (a) y géneros (b) bacterianos identificados y las propiedades fisicoquímicas del suelo incluido el Cdt y el Cda.	65
Figura 20. Correlaciones entre los filios (a) y géneros (b) bacterianos y las propiedades fisicoquímicas del suelo.	66
Figura 21. Abundancia relativa de las principales vías metabólicas predichas por Tax4Fun y anotadas en KEGG para los sitios de muestreo.	67

Figura 22. Abundancia diferencial de las principales vías metabólicas predichas por Tax4Fun discriminado por finca: F1 (verde); F2 (naranja); F3(morado)..... 67

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1. Protocolo de extracción y cuantificación de ADN.....	81
ANEXO 2. Cebadores utilizados para la amplificación y preparación de librerías metagenómicas.	81
ANEXO 3. Flujo de trabajo bioinformático.....	83
ANEXO 4. Resultados de los análisis fisicoquímicos de los suelos y concentración de Cdt y Cda.....	83
ANEXO 5. Diferencias entre propiedades fisicoquímicas y significancia estadística estimadas con Wilcoxon.	84
ANEXO 6. Información sobre el número de secuencias por muestra obtenido antes y después de su procesamiento.....	85
ANEXO 7. Coeficientes de correlación de Spearman entre las variables fisicoquímicas y los índices de diversidad alfa.	86
ANEXO 8. Resultados de la comparación entre sitios de muestreo mediante PERMANOVA.	87

1. INTRODUCCIÓN

Los metales pesados son elementos químicos de alta densidad que se encuentran naturalmente en diversos ecosistemas, incluidos los suelos. El nivel de concentración presente en los suelos puede aumentar como consecuencia de la práctica indiscriminada de actividades antropogénicas como la minería, la galvanoplastia, la incineración de desechos, la aplicación de pesticidas y fertilizantes con alto contenido de fosfato, entre otros (Bigalke *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2013); o por causas geogénicas, propias de la formación de los suelos como la composición del material parental (Gramlich *et al.*, 2018; Quezada-Hinojosa *et al.*, 2015). Algunos metales pesados como el zinc (Zn), el cobre (Cu), el manganeso (Mn), el cobalto (Co), el hierro (Fe), el molibdeno (Mo) y el níquel (Ni) son esenciales para el desarrollo, crecimiento y diferenciación de microorganismos, plantas y animales (Suryawati, 2021; Tiwari y Lata, 2018). Sin embargo, cuando se encuentran en altas concentraciones, pueden causar efectos negativos en estos (Pérez *et al.*, 2020). Dentro de los metales pesados no esenciales que representan un peligro potencial para los ecosistemas se encuentra el cadmio (Cd), el cromo (Cr), el plomo (Pb), el mercurio (Hg), el estaño (Sn), la plata (Ag), el berilio (Be), el antimonio (Sb), el titanio (Ti), y el talio (Tl) (Pérez *et al.*, 2020; Rosales-Huamani *et al.*, 2020).

El Cd no tiene una función biológica conocida, se caracteriza por ser altamente tóxico a bajas concentraciones para los organismos vivos (Haider *et al.*, 2021) y muy móvil en el sistema suelo – planta (Chen *et al.*, 2016), lo que facilita su translocación y acumulación en los diferentes tejidos de las plantas (raíces, tallos, hojas, frutos y semillas) (Chavez *et al.*, 2015; Gramlich *et al.*, 2017; Montaña Lara, 2015). Estudios de caso realizados en varios cultivos incluidos arroz, trigo, tomate y cacao han demostrado que altas concentraciones de Cd afectan la fisiología y bioquímica de las plantas (Abbas *et al.*, 2017; Baruah *et al.*, 2019; Kanu *et al.*, 2017; Oliva *et al.*, 2020). Se ha reportado alteración en la absorción de nutrientes minerales debido a que el Cd tiene la capacidad de reemplazar o desplazar otros elementos químicos inhibiendo su funcionamiento, también afecta la actividad de las enzimas del ciclo de Calvin, la fotosíntesis, el metabolismo de los carbohidratos y antioxidantes causando una reducción en la productividad del cultivo (Chellaiah, 2018; Edwards *et al.*, 2013). Sin embargo, el efecto del Cd sobre la planta depende del genotipo y la disponibilidad del Cd en el suelo (Zulfiqar *et al.*, 2021). Adicionalmente, el Cd puede alterar la diversidad estructural y funcional de la comunidad bacteriana que habita en estos agroecosistemas (Guo *et al.*, 2017; Salam *et al.*, 2020; Shentu *et al.*, 2008).

El cultivo tradicional de cacao es considerado en varios países un componente dinamizador de la economía (Sánchez *et al.*, 2019). Su importancia se ve reflejada en los 5,024 millones de toneladas que se produjeron a nivel mundial durante el periodo 2020-2021 (ICCO, 2021). Países como Costa de Marfil, Ghana, Camerún, Nigeria e Indonesia tienen la mayor producción (78,1%), seguidos de Ecuador, Brasil, Perú, República Dominicana (14,8%) y Colombia (1,3%) (ICCO, 2021). Para Colombia, la producción de cacao ha aumentado de 37.719 a 69.040 toneladas durante los años 2008 al 2021 (FEDECACAO, 2021). Los

departamentos de mayor producción son Santander (41%), Antioquia (9%), Arauca (8%), Huila (8%), Tolima (7%), Nariño (5%) y Cundinamarca (3%) (FEDECACAO, 2021). Caparrapí es el municipio más sobresaliente de Cundinamarca, seguido de Yacopí con una producción de 1.148 toneladas por año (Plan Departamental de Extensión Agropecuaria-PDEA, 2020).

El cacao es un cultivo importante para el país. Se caracteriza por tener un fino sabor y aroma, por lo que es muy apetecido a nivel mundial ya que solo el 5% del cacao en el mundo posee dichas cualidades (FINAGRO, 2020). Además, el cultivo representa una fuente importante de ingresos para alrededor 65.000 familias colombianas (FINAGRO, 2020) y es considerado una alternativa promisoriosa para sustituir los cultivos ilícitos (Sánchez *et al.*, 2019). Para exportar el grano, es importante asegurar que éste esté libre de contaminantes; pero, existen reportes que muestran que el cacao colombiano contiene Cd a concentraciones mayores a los límites permitidos por la Comisión Europea (Bravo *et al.*, 2018; Gil *et al.*, 2022; Soler, 2017). Estos límites dependen del porcentaje de cacao presente en el chocolate o productos derivados y van desde 0.1 - 0.8 mg Kg⁻¹ de Cd (Zug *et al.*, 2019). Este problema también lo tienen otros países de Centro y Sur América (Mite *et al.*, 2010; Villa *et al.*, 2014), lo que dificulta su comercialización y afecta la economía de la cadena productiva del cultivo.

Entre los métodos reportados para disminuir la disponibilidad de metales pesados del suelo, se encuentran: la oxidación y la precipitación química, la electrodiálisis, la ultrafiltración, la floculación y el intercambio iónico, entre otros (Al-Dhabi *et al.*, 2019; Gupta y Diwan, 2017). Sin embargo, en estos métodos la eliminación del metal es incompleta y pueden generar subproductos altamente tóxicos que contaminan el ambiente, como los que se presentan durante los procesos de floculación en donde se genera una enorme cantidad de lodo (Gupta y Diwan, 2017). En contraste, el uso de bacterias con capacidad de tolerar concentraciones elevadas de metales pesados se ha convertido en una alternativa que permite disminuir la concentración de metales pesados en el suelo sin generar toxicidad en el medio ambiente (Fauziah *et al.*, 2017; Nwaehiri *et al.*, 2020).

Las bacterias han desarrollado mecanismos de tolerancia intra y extracelulares que les permiten tolerar el estrés causado por altas concentraciones de metales pesados. Entre los mecanismos reportados se encuentran: el secuestro extracelular, la biosorción (quimiosorción y adsorción), la expulsión del metal fuera de la célula mediante bombas de eflujo, la precipitación y bioacumulación dentro de las células (Abbas *et al.*, 2017; Bravo *et al.*, 2022; Jebril *et al.*, 2022). En lo que respecta a las bombas de eflujo, se han descrito principalmente tres familias: las ATPasas de tipo P, que utilizan energía ATP para bombear iones metálicos desde el citoplasma al exterior (Icgen y Yilmaz, 2016); los transportadores compuestos por la familia RND (resistencia, nodulación, división celular), que actúan como un sistema de exportación impulsado por protones (Zeng *et al.*, 2012); y los facilitadores de difusión catiónica (CDF), que funcionan como un intercambiador quimiosmótico de iones y protones (Fierros-Romer *et al.*, 2016). Sin embargo, para usar la comunidad bacteriana como estrategia de remediación del metal pesado es importante identificar filogenéticamente las bacterias que habitan en los suelos cacaoteros y estudiar como estas se ven afectadas por la presencia de Cd a diferentes concentraciones.

Para el estudio de microorganismos se han desarrollado métodos dependientes e independientes del cultivo de microorganismos (Hinsu *et al.*, 2021). Los métodos dependientes de cultivo son empleados para investigar los microorganismos viables y cultivables presentes en una muestra ambiental. Sin embargo, estos métodos tienen sus desventajas debido a que menos del 0,1% de los microorganismos pueden ser cultivados e identificados en condiciones de laboratorio, quedando un 99% sin identificar; por lo tanto, la identificación de microorganismos se ha visto limitada mediante ensayos dependientes del cultivo (Altowayti *et al.*, 2020). Por otra parte, los métodos independientes de cultivo que se basan en la secuenciación de nueva generación (NGS) como la metagenómica (Feng *et al.*, 2018; Salam *et al.*, 2020) y la metataxonómica (Cáceres *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2020; Luo *et al.*, 2019) se han convertido en herramientas útiles para la detección e identificación de comunidades bacterianas presentes en los suelos que se detectan y no se detectan mediante el cultivo en placas, siempre que la eficiencia de la amplificación sea lo suficientemente alta (Liu *et al.*, 2020).

En Colombia, la mayoría de los estudios se han centrado en la identificación de la comunidad bacteriana cultivable presente en suelos cacaoteros contaminados con Cd (Bravo *et al.*, 2018; Cáceres, 2017; Córdoba-Novoa *et al.*, 2021; Quiroga-Mateus *et al.*, 2022) y muy pocos en la comunidad bacteriana no cultivable (Cáceres *et al.*, 2021), lo que indica que hay información limitada con relación a la ecología microbiana de los suelos cacaoteros y que existe la necesidad de ampliar la información para diseñar estrategias de biorremediación de suelos cacaoteros contaminados con Cd. En esta investigación se seleccionaron tres fincas cacaoteras con suelos que presentaban diferentes concentraciones de Cd total (F1, F2 y F3), se muestrearon tres tipos de suelo (suelo rizosférico y suelo a dos profundidades) en dos tipos de lote (con cultivo y sin cultivo de cacao) y se realizó la secuenciación de la región hipervariable V4 del gen 16S ARNr para evaluar y comparar el efecto del Cd y las propiedades fisicoquímicas de los suelos cacaoteros sobre la diversidad de la comunidad bacteriana y también predecir la posible función que está cumpliendo la comunidad en estos ecosistemas.

2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Las propiedades fisicoquímicas y las concentraciones variables de Cd natural generan cambios en la diversidad de la comunidad microbiana presente en los suelos cacaoteros estudiados?

3. HIPÓTESIS

Las diferentes concentraciones de Cd natural presentes en suelos cacaoteros del municipio de Yacopí-Cundinamarca ejercen presión selectiva sobre la estructura de las comunidades bacterianas, lo que puede evidenciarse por la disminución en su riqueza y el aumento en la abundancia de poblaciones bacterianas mejor adaptadas a suelos con alta concentración de Cd.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar la diversidad de la comunidad bacteriana presente en suelos cacaoteros con diferentes concentraciones de cadmio natural del municipio de Yacopí-Cundinamarca.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la diversidad estructural de la comunidad bacteriana presente en suelos rizosféricos y suelos a dos profundidades con diferentes concentraciones de cadmio.
- Evaluar el efecto de las concentraciones de cadmio y las propiedades fisicoquímicas sobre la diversidad estructural de las comunidades bacterianas identificadas presentes en los suelos cacaoteros.
- Realizar una aproximación funcional de la comunidad bacteriana presente en los suelos cacaoteros muestreados.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 SUELOS AGRÍCOLAS Y EL CULTIVO DE CACAO

5.1.1 Definición de suelo

Según el Servicio de Conservación de Recursos Naturales (NRCS) el suelo es definido como: *“Un cuerpo natural compuesto de sólidos (materia mineral y orgánica), líquidos y gases que se encuentra en la superficie de la tierra, ocupa espacio y se caracteriza por uno o ambos de los siguientes componentes: horizontes o capas que se distinguen del material inicial como resultado de adiciones, pérdidas, transferencias y transformaciones de energía y materia o la capacidad de soportar plantas enraizadas en un entorno natural ”* (Schoonover & Crim, 2015).

Los horizontes o capas individuales son un componente común de la mayoría de los suelos típicos. Cada una de estas capas están organizadas de forma secuencial (una encima de la otra) para formar lo que se conoce como “perfil del suelo”, y se clasifican de acuerdo con sus propiedades como: O (capa orgánica), A (capa superficial), E (capa de eluviación), B (subsuelo), C (roca madre) y R (base) (Ver Fig. 1) (Schoonover y Crim, 2015; Soil Survey Staff, 2014).

El suelo no sólo les proporciona apoyo a las raíces de las plantas, sino también les otorga minerales, nutrientes esenciales y, además, las protege de la erosión y otras actividades físicas y químicas. El suelo es un ecosistema en el que también habitan una amplia variedad de organismos vivos como insectos y microorganismos. Estos últimos desempeñan una importante función en la estabilidad de dicho ecosistema, ya que participan en el proceso de formación de su estructura, la descomposición de la materia orgánica, y también juegan un papel importante en el ciclaje de nutrientes (Kaviya *et al.*, 2019).

Aunque el suelo es muy variable, existen cuatro fracciones que son compatibles con todos los tipos de suelo. Dentro de estas fracciones se encuentran los minerales (45 al 48%), la materia orgánica (2 al 5%), el agua (25%) y el aire (25%). Estas cuatro fracciones a su vez, se dividen en dos categorías: sólidas (materia mineral y orgánica) y no sólidas (agua y aire) (Soil Survey Staff, 2014).

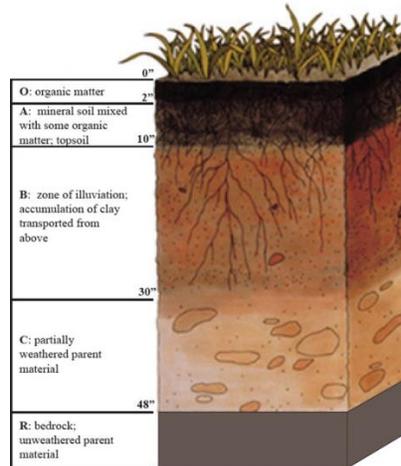


Figura 1. Perfil de suelo típico. Fuente: USDA NRCS. Adaptado por Schoonover & Crim (2015).

5.1.2 Propiedades físicas y químicas del suelo

Dentro de las propiedades físicas del suelo se incluyen el color, la textura, la estructura, la porosidad, la densidad, la consistencia, la temperatura y el aire (FAO, 2015; Osman, 2012). Con respecto al color, este puede variar ampliamente en cada suelo y refleja propiedades tan importantes como la materia orgánica, el agua y las condiciones redox (Kekane *et al.*, 2015). La textura, estructura, porosidad, densidad y consistencia del suelo están principalmente relacionadas con el material parental (por ejemplo, lecho rocoso erosionado, limo eólico, sedimento marino o lacustre, entre otros). Por otra parte, la pendiente, la elevación, el clima y la meteorización otorgan a cada suelo una combinación y disposición distintiva de diferentes tipos de partículas (arena, limo y arcilla), que puede incluir o no, fragmentos más grandes de roca (Callaham y Stanturf, 2021). Estas propiedades afectan directamente la cantidad y composición del aire del suelo y su renovación (Osman, 2012). Se ha establecido que los suelos arenosos contienen más aire en comparación con los suelos arcillosos, pues los primeros poseen poros más grandes que contribuyen en la aireación y el drenaje, y también, permiten que haya un intercambio de gases más rápido (Kekane *et al.*, 2015; Osman, 2012).

La textura del suelo tiene efecto sobre la aireación y la penetración de las raíces (Kekane *et al.*, 2015). Esta propiedad determina en gran medida la capacidad de retención de agua, y a su vez, la cantidad de agua está fuertemente relacionada con el número y tipo de organismos (macroscópicos y microscópicos) que habitan e interactúan con el suelo (Callaham y Stanturf, 2021). Por tanto, la diversidad microbiana varía con respecto a la textura del suelo (Naorem *et al.*, 2021). Estudios de caso, indican que los suelos arenosos benefician a la comunidad fúngica, mientras que los suelos arcillosos son propicios para la comunidad bacteriana (Li *et al.*, 2018; Naorem *et al.*, 2021).

La temperatura del suelo es levemente mayor (rango de temperatura: entre -20 a 60 °C) que la temperatura del aire en un lugar e influye en los procesos vitales de la biota que se

encuentra presente allí, incluidas las plantas (Kekane *et al.*, 2015; Osman, 2012). Por su parte, el aire, es retenido en los poros del suelo y su composición es variable; se ha demostrado que posee un contenido más elevado de dióxido de carbono y una menor concentración de oxígeno en comparación con el aire atmosférico (Kekane *et al.*, 2015). El aire del suelo cumple un papel importante en el proceso de respiración de las plantas y los microorganismos y también, en la transformación de la materia mineral y orgánica (Osman, 2012).

El pH, la capacidad de intercambio catiónico (CIC), la conductividad eléctrica (CE) y la materia orgánica son consideradas propiedades químicas del suelo (FAO, 2015; López y Estrada, 2015). Estas propiedades reflejan el comportamiento de las sustancias, los elementos y los componentes que integran el suelo (López y Estrada, 2015). El pH es una medida que permite determinar la concentración de iones hidrógeno cargados positivamente (H^+) en la solución del suelo e indica la alcalinidad o acidez de un suelo (FAO, 2015; Kekane *et al.*, 2015; López y Estrada, 2015). La escala de pH va de 0 a 14 (USDA, 2014). Se considera que un suelo es ácido cuando su pH es inferior a 6; es normal cuando su pH está entre 6 a 8,5 y alcalino cuando es superior a 8,5 (Kekane *et al.*, 2015). Así mismo, según la FAO, esta propiedad determina la disponibilidad, movilidad, solubilidad y absorción de nutrimentos para las plantas (FAO, 2015).

La CIC (capacidad de intercambio catiónico) refleja la capacidad de retención de cationes totales en el suelo (incluidos los nutrientes) (FAO, 2015) y, por lo tanto, la disponibilidad y cantidad potencial de nutrientes para la planta (López y Estrada, 2015). Algunos nutrientes y metales pesados se encuentran como iones cargados positivamente o "cationes" en el entorno del suelo (USDA, 2014). Entre los cationes más encontrados en el suelo se encuentran el hidrógeno (H^+), el aluminio (Al^{+3}), el calcio (Ca^{+2}), el magnesio (Mg^{+2}) y el potasio (K^+) (USDA, 2014). Por otro lado, la conductividad eléctrica (CE), es una medida de los iones presentes en la solución acuosa del suelo y refleja su capacidad para transportar corriente eléctrica (Tale *et al.*, 2015), la cual es directamente proporcional al contenido de sales disueltas o ionizadas contenidas en el suelo (Doerge *et al.*, 2015).

Los residuos vegetales y animales son el componente principal de la materia orgánica (MO) (Kekane *et al.*, 2015). Tanto las interacciones físicas, como químicas y biológicas que ocurren en el suelo se ven influenciadas por la cantidad y el tipo de MO (Mayer *et al.*, 2020). La MO se clasifica de acuerdo con su grado de descomposición en lábil y recalcitrante (FAO 2015). La materia orgánica lábil tiene un periodo de permanencia corto en el suelo y es más fácil de digerir por los microorganismos, mientras que la MO recalcitrante o humus es más estable y permanece por más tiempo en dicho ecosistema, pues está compuesta principalmente de compuestos químicos complejos como ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas (López y Estrada, 2015). El humus interviene en algunos procesos como la regulación del pH, la lixiviación de nutrientes, la retención del agua, la integración de ácidos orgánicos que favorecen que haya una mayor disponibilidad de nutrientes para las plantas, entre otros (FAO, 2015; Hazelton y Murphy, 2016).

En el suelo, también se encuentran sustancias químicas denominadas nutrientes, las cuales contribuyen al desarrollo y crecimiento de las plantas (López y Estrada, 2015). Dichas sustancias se clasifican en macro y micronutrientes (Jhonson, 2009). Dentro de los macronutrientes se incluyen el nitrógeno (N), el fósforo (P), el potasio (K), el calcio (Ca), el magnesio (Mg) y el Azufre (S) (FAO, 2019). Por otra parte, el hierro (Fe), el zinc (Zn), el manganeso (Mn), el boro (B), el cobre (Cu), el molibdeno (Mo) y el cloro (Cl) se consideran micronutrientes (FAO, 2019). La disminución de estos nutrientes dentro del ecosistema del suelo causa un déficit en el desarrollo de las plantas y hace que estas se vuelvan más propensas a enfermedades y ataques por parte de insectos (Hall, 2008; Jhonson, 2009).

5.1.3 Suelos contaminados con metales pesados

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y el Grupo Técnico Intergubernamental de Suelos (GTIS) el término contaminación del suelo se refiere a: *“La presencia en el suelo de un químico o una sustancia fuera de sitio y/o presente en una concentración más alta de lo normal que tiene efectos adversos sobre cualquier organismo al que no están destinados”* (Rodríguez *et al.*, 2019).

En los suelos agrícolas, se ha detectado la presencia natural de metales pesados en cantidades mínimas. Sin embargo, cuando su concentración excede el nivel máximo permitido a causa de múltiples factores, como la polución del sistema fluvial y el aire originado por la industria, y la minería contamina el cultivo y también los productos agrícolas. Entre estos metales pesados se encuentra el cobre (Cu), el cadmio (Cd), el arsénico (As), el zinc (Zn), el plomo (Pb), el mercurio (Hg), el antimonio (Sb) y el cromo (Cr). En particular, el Cd es uno de los metales pesados más nocivos (Genchi *et al.*, 2020) (Tabla 1).

Tabla 1. Concentración total de algunos metales pesados de interés agrícola.

Metal pesado	Esencial	Rango normal en plantas (mg·Kg ⁻¹)	Rango normal en suelos (mg·Kg ⁻¹)	Suelos tóxicos para las plantas (mg·Kg ⁻¹)
Zinc (Zn)	Si	1 – 160	90	70 – 400
Cobre (Cu)	Si	0.4 – 45.8	30	60 – 125
Hierro (Fe)	Si	640 – 2486	–	–
Manganeso (Mn)	Si	15 – 100	1000	1500 – 3000
Molibdeno (Mo)	Si	0.1 – 0.5	<1 – 5	–
Níquel (Ni)	Si	0.1 – 3.7	50	100
Cobalto (Co)	Si	0.1 – 10	8	–
Selenio (Se)	Si	0.002 – 0.08	–	–
Arsénico (As)	Si	5	6	20

Cadmio (Cd)	No	2	0.35 – 0.37	3 – 8
Cromo (Cr)	No	0.006 – 18	70	75 – 100
Plomo (Pb)	No	3	35	100 – 400
Mercurio (Hg)	No	<0.1 – 0.5	1	–
Plata (Ag)	No	0.01	–	–

Nota. Adaptada de Hajar *et al.* (2014).

El Cd (número atómico 48, peso atómico 112,41) es un metal blando y de color blanco plateado físico-químicamente similar al Zn y al Hg (Genchi *et al.*, 2020). Su presencia en el ecosistema del suelo se debe principalmente a factores geogénicos y antropogénicos (Kubier *et al.*, 2019). El origen geogénico se le atribuye a la descomposición de las rocas, los incendios forestales y las erupciones volcánicas (Gramlich *et al.*, 2018), y el antropogénico a la industria metalúrgica, la minería, el uso de fertilizantes fosfatados y otras actividades industriales (Bigalke *et al.*, 2017). Esto indica que su concentración en el suelo va a depender del origen y de las prácticas agrícolas que se realicen en él.

En muchas partes del mundo, la concentración natural de Cd en el suelo se encuentra entre 0,07 y 1,1 mg Kg⁻¹, con un nivel base natural que no excede de 0,5 mg Kg⁻¹, sin embargo, esta varía de acuerdo con el tipo de suelo (Charrupi & Martínez, 2017; Rofner, 2021). Se ha observado que en suelos ubicados sobre rocas sedimentarias y suelos tratados con fertilizantes fosfatados contienen concentraciones más altas de Cd que oscilan entre 0.3 a 15 mg Kg⁻¹ (Shahid *et al.*, 2017). A pesar de ello, se han establecido niveles que permiten determinar el grado de contaminación por dicho metal pesado en donde suelos con concentraciones inferiores a 0,41 mg·Kg⁻¹ se consideran no contaminados; así mismo, los suelos que presentan concentraciones entre 1 y 3 mg·Kg⁻¹ se denominan levemente contaminados y los que presentan concentraciones entre 3 y 10 mg·Kg⁻¹ se clasifican como severamente contaminados (Rodríguez-Albarrcín *et al.*, 2019). El cadmio (Cd) está presente principalmente como iones de Cd o formando complejos, es decir, orgánicos e inorgánicos en la solución del suelo (Zulfiqar *et al.*, 2021). Tanto las formas aniónicas (CdCl₃⁻, Cd(OH)₃⁻, Cd(OH)₄²⁻ y Cd(HS)₄²⁻) como las catiónicas (CdCl⁺, CdOH⁺, CdHS⁺ y CdHCO³⁺) del metal existen en los suelos (Zulfiqar *et al.*, 2021).

El Cd total presente en el suelo, abarca las tres fracciones en las que se encuentra el Cd en el suelo y que se clasifica de acuerdo con su biodisponibilidad en: fracción no intercambiable, fracción intercambiable y la fracción en la solución de suelo (Meter *et al.*, 2019). La fracción no intercambiable es aquella donde el Cd está unida a minerales primarios y secundarios, y no se espera que ingrese en la fracción intercambiable durante décadas o siglos. La fracción intercambiable, consiste en iones Cd relativamente disponibles para la absorción por la planta, pues se encuentran unidos a superficies sólidas como la materia orgánica del suelo, los óxidos metálicos hidratados, los carbonatos y la arcilla, y, por lo tanto, se libera fácilmente en la solución del suelo. La fracción en la solución de suelo se compone de iones Cd⁺² libres o formando complejos metálicos solubles como CdCl⁺, CdCl₂, CdSO₄ (complejos

inorgánicos) o fitometaloforos (complejos orgánicos) que están completamente listos para ser directamente absorbidos por la planta (Irfan *et al.*, 2013; Meter *et al.*, 2019). Se ha encontrado que el 99% de Cd está presente en la solución del suelo como forma iónica libre (Zulfiqar *et al.*, 2022). El movimiento de la fracción intercambiable hacia la porción soluble del suelo se ve influenciado por varios factores dentro de los que se incluye el pH, el contenido de materia orgánica, el contenido de arcilla, la capacidad de intercambio catiónico, la presencia de microorganismos, los exudados de las raíces, entre otros. Estos factores cambian con el tiempo, el clima y la profundidad del suelo (Shahid *et al.*, 2017).

A pesar de que el Cd se presenta en varias formas en los suelos, muchas de estas no están disponibles para ser adsorbidos por las plantas (Liu *et al.*, 2018). Se ha descrito que las raíces son la principal vía a través de la cual el Cd entra a la planta (Ge *et al.*, 2012), sin embargo, para ser absorbido por estas, el metal debe estar en su forma divalente (Cd^{2+}), lo que depende de la especiación del metal, las especies de plantas y las condiciones fisicoquímicas del suelo (El-Rasafi *et al.*, 2022; Rizwan *et al.*, 2018). La captación de iones Cd por las raíces de la planta se puede producir a través de transportadores implicados en la captación de Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} (Haider *et al.*, 2021; Ismael *et al.*, 2019) o a través de las paredes celulares mediante transporte pasivo (difusión) (Rog-Young *et al.*, 2015) (Fig. 2). La absorción de Cd a través de la membrana plasmática de las células de la raíz está regulada por la diferencia de potencial electroquímico entre la actividad de Cd en el citosol y el apoplasto de la raíz (Haider *et al.*, 2021). El potencial de membrana proporciona suficiente energía para impulsar la captación de Cd incluso a concentraciones muy bajas del metal (Haider *et al.*, 2021). A bajas concentraciones de Cd en la rizosfera, la raíz retiene la mayor parte del Cd que ingresa a la planta, pero la fracción retenida por las raíces disminuye a medida que aumenta la concentración de Cd en la rizosfera (Lux *et al.*, 2011). La concentración de Cd en la raíz está influenciada por la concentración de Cd en el sustrato, la fitodisponibilidad de Cd, y la duración de la exposición al metal (Lux *et al.*, 2011). Por otra parte, se ha descrito que la acidificación de la rizosfera y la exudación de carboxilatos son considerados factores que potencian la acumulación de metales pesados (Heider *et al.*, 2021). En especial, se ha investigado el papel de los carboxilatos, por su impacto potencial en la biogeoquímica de los metales a través de procesos acuosos de complejación e intercambio de ligandos (Seshadri *et al.*, 2015). Entre la gama de carboxilatos exudados en la rizosfera, el malato, el citrato y el oxalato tienen el efecto más drástico debido a su capacidad para formar complejos de metaloides (Seshadri *et al.*, 2015).

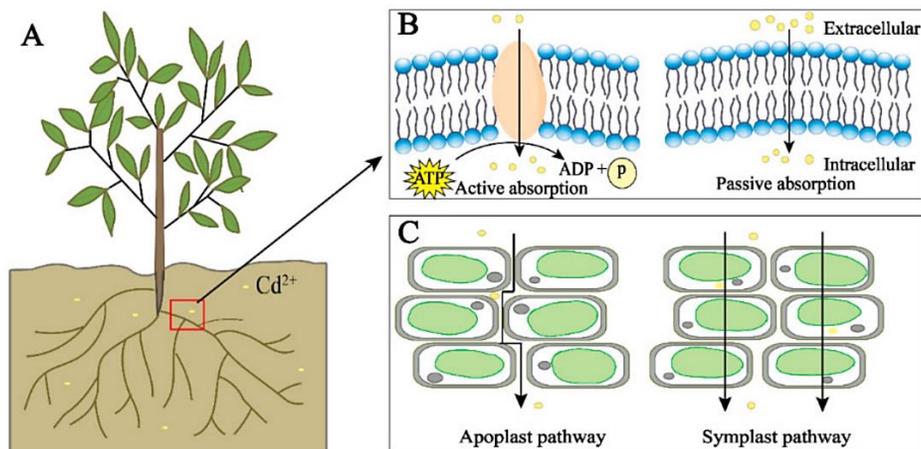


Figura 2. Absorción de cadmio por las raíces en las plantas. El Cd (amarillo) en el medio ambiente puede ingresar a las plantas a través de las raíces de las plantas (A); cuando la concentración de Cd es baja, se consume ATP para transporte activo, y cuando la concentración es alta, entra directamente a las células para absorción pasiva (B); El Cd es transportado entre células por las vías de apoplasto y simplasto (C). Tomado de Yang *et al.* (2021).

Una vez el Cd es absorbido se traslada al citosol y luego a las células del periciclo, llegando finalmente al xilema, para ser transportado a las partes aéreas de la planta (Wu *et al.*, 2015). La entrada y acumulación de Cd en las células vegetales conduce a la activación de la vía del calcio-calmodulina, la síntesis de fitohormonas y la señalización mediada por ROS (especies reactivas de oxígeno) (Bali *et al.*, 2019).

Estudios previos han investigado sobre el origen (geogénico o antropogénico) y la concentración de Cd en diversos suelos, dentro de los que se incluyen los usados para cultivos agrícolas. En Suiza, Quezada-Hinojosa *et al.* (2015) realizaron un análisis mineralógico y geoquímico en seis tipos de suelo naturalmente enriquecidos con Cd, en donde detectaron concentraciones máximas de hasta $16,3 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ en diferentes plantas perennes. Este alto contenido de Cd lo relacionaron principalmente con el material parental del suelo. Por otra parte, Gramlich *et al.* (2018), llevaron a cabo un estudio en suelos cultivados con cacao en Honduras, y detectaron contenidos de $0,25$ y $0,14 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$, de Cd total y disponible respectivamente, lo que los clasifica como suelos no contaminados por dicho metal. En Colombia, Soler (2017) reportó concentraciones de Cd total superiores a $2,2 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ y $3,3 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ en regiones productoras de cacao ubicadas en el departamento de Cundinamarca (Nilo y Yacopí respectivamente), las cuales se atribuyeron al material de la roca madre y al uso de fertilizantes contaminados por Cd. Por otro lado, Gil *et al.* (2020), reporta concentraciones de Cd total de $1,22$ y $2,03 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ en suelos de fincas cacaoteras ubicadas en el departamento de Antioquia, Estos autores indican que los niveles de Cd encontrados se debían no solo al uso de fertilizantes sino también a la descomposición de la hojarasca. Por otra parte, Aguirre-Forero *et al.* (2020) y Bravo *et al.* (2021b) reportaron bajos y altos contenidos del metal en Magdalena (Cd total $0,19 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$) y Santander (Cd total: $3,50 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$) respectivamente. La **Fig. 3** muestra la distribución geográfica del Cd basada en

muestras de suelo tomadas en varias áreas de producción de cacao en Colombia (Bravo *et al.*, 2021a).

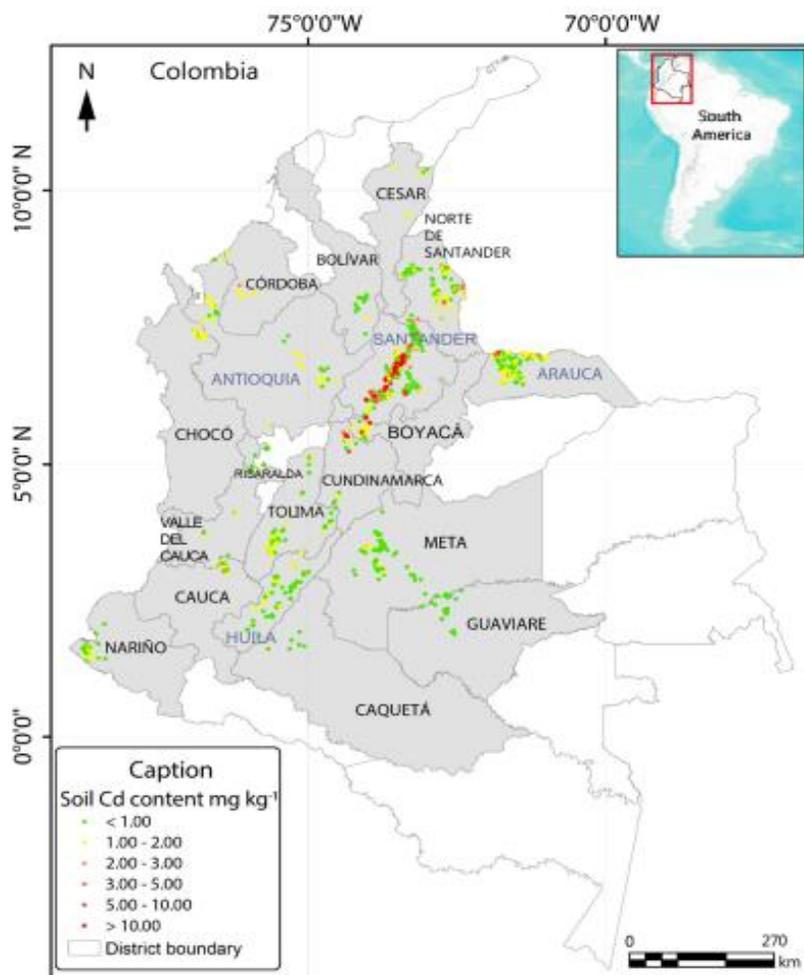


Figura 3. Distribución de Cd total en el suelo de fincas cacaoteras en Colombia. La escala de colores muestra los niveles de concentración de Cd. Los distritos de Santander y Boyacá presentan los valores más altos de Cd (puntos rojos). Antioquia, Caquetá, Guaviare, Huila, Meta, Risaralda y Tolima presentan concentraciones de $Cd \leq 2 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ (puntos verdes y amarillos). Tomado de Bravo *et al.*, 2021a.

El Cd no tiene ninguna función biológica conocida y puede causar efectos tóxicos en plantas, animales y humanos. Se ha demostrado que la exposición a bajas concentraciones de este metal, puede ocasionar alteraciones en la salud humana tales como cáncer, insuficiencia renal, osteoporosis, anemia, diabetes mellitus y problemas pulmonares crónicos (Rahimzadeh *et al.*, 2017). En las plantas, el Cd las afecta a nivel morfológico, fisiológico, bioquímico y molecular (El-Rasafi *et al.*, 2022) alterando la fotosíntesis, la fijación del carbono y del nitrógeno, la asimilación del amoníaco y la absorción, transporte y uso de minerales, agua y varios elementos como Ca, Zn, Mg, P y K (Haider *et al.*, 2021). La toxicidad del Cd en las plantas puede evidenciarse por la aparición de clorosis, enrollamiento de las hojas, retraso en el crecimiento y necrosis (Bagheri *et al.*, 2014).

La capacidad de absorción de Cd varía entre especies y genotipos de plantas debido a la variación morfológica, las características fisiológicas (Gupta *et al.*, 2019; Yadav *et al.*, 2018) y las etapas de crecimiento de la planta (Manousaki y Kalogerakis, 2009). Algunas plantas, llamadas hiperacumuladoras, son especies o genotipos que absorben activamente grandes cantidades de metales tóxicos y los almacenan en sus tejidos superficiales sin sufrir ningún efecto fitotóxico perceptible (Küpper y Leitenmaier, 2013). Las plantas hiperacumuladoras de Cd se caracterizan porque pueden tolerar y acumular Cd en niveles superiores a 100 mg·Kg⁻¹ (peso seco) en los brotes (He *et al.*, 2017; Meter *et al.*, 2019; Peng *et al.*, 2019). A la fecha, son pocas las especies que han sido descritas como hiperacumuladoras de Cd (Ismael *et al.*, 2019). Dentro de estas se destacan *Sedum alfredii* y *Arabidopsis thaliana*, las cuales pueden llegar a acumular hasta 9.000 y 6.000 mg·Kg⁻¹ de Cd en los brotes (peso seco) respectivamente (Ismael *et al.*, 2019; Lin *et al.*, 2020).

La mayoría de las plantas hiperacumuladoras de Cd, bajo estrés por el metal (toxicidad moderada a alta) no muestran síntomas tóxicos como necrosis, clorosis y disminución significativa en la biomasa de los brotes, incluso, a veces se observa una correlación positiva entre las concentraciones de Cd y la planta (Ismael *et al.*, 2019). A diferencia de las hiperacumuladoras de Cd, las no acumuladoras sufren varios síntomas tóxicos que fluctúan de acuerdo con el grado de contaminación del suelo, el período y el momento de la exposición, las especies de plantas, los cultivares y la presencia de otros cationes y nutrientes, que pueden afectar la absorción o el transporte del metal (Ismael *et al.*, 2019). Los experimentos de laboratorio con plántulas de cacao utilizando suelos enriquecidos con 50 y 100 mg·Kg⁻¹ de Cd informaron cambios ultraestructurales y daños en la maquinaria fotosintética y el metabolismo antioxidante (Castro *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2017), lo que sugiere que el cacao no puede ser considerado como un hiperacumulador. Sin embargo, Pereira *et al.* (2017) interpretaron el hecho de que las plantas translocasen Cd a los tejidos aéreos como una señal de tolerancia al Cd, ya que las plantas no tolerantes tienden a tener una mayor acumulación en las raíces (Verbruggen *et al.*, 2009). Estos estudios también reportaron evidencia de diferencias genotípicas en la tolerancia al Cd (Castro *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2017).

5.1.4 Cultivo de cacao

Theobroma cacao L. (familia Malvaceae, subfamilia Sterculioideae), fruto de los dioses o más comúnmente conocido como cacao, es una planta que se encuentra naturalmente en el Amazonas y el Orinoco. Fue descrita, clasificada y nombrada en primera instancia por el naturalista Carl Linneo en el año 1.735 (Rojas y Sacristán, 2013). Se han descrito tres variedades del *Theobroma cacao* L. conocidas como: cacao criollo (*T. Cacao* ssp. *cacao*), cacao forastero (*T. Cacao* ssp. *sphaerocarpum*) cacao trinitario (producto del cruce entre criollo con forastero).

El cacao criollo es originario de Centroamérica, Colombia y Venezuela, se distingue por tener frutos alargados con surcos pronunciados, superficie áspera o verrugosa, cáscara blanda y semillas grandes y redondeadas, rojas/verdes cuando no están maduras, amarillas/naranja cuando están maduras con hojas blancas o de color violeta pálido (Arizo *et al.*, 2019; De-Souza *et al.*, 2018). Por su parte, el cacao forastero, es el que más se cultiva en las regiones cacaoteras de África occidental y Brasil, tiene frutos de color verde o amarillo, redondeados con surcos escasamente evidentes y semillas planas de color púrpura y finalmente el cacao trinitario, por ser una variedad híbrida, tienen mazorcas y semillas parecidas a los dos grupos mencionados anteriormente (Jahurul *et al.*, 2012; Rojas y Sacristán, 2013). Los árboles de cacao trinitario se cultivan principalmente en el Caribe, pero también en Camerún y Papua Nueva Guinea (De-Souza *et al.*, 2018).

A nivel mundial, en el mercado comercial se reconocen dos grandes categorías de cacao en grano: el cacao “fino o de aroma” y el cacao “al granel” o “común”. Generalmente, el cacao fino o de aroma es producido por árboles de cacao de variedad Criollo o Trinitario, mientras que el cacao al granel proviene de la variedad de árbol Forastero (Arizo *et al.*, 2019). Colombia tiene varias regiones productoras de cacao con diversas características agroecológicas, incluidas las condiciones climáticas, los tipos de suelo y los sistemas de cultivo (Gil *et al.*, 2020). Esto ha resultado en la producción de granos de cacao finos, principalmente derivados de las variedades de cacao “Criollo” y “Trinitario” en todo el país (Barrientos *et al.*, 2019; Gil *et al.*, 2020).

Los granos de cacao tienen varios usos, como la elaboración de chocolates y grasas por industrias alimentarias o cosmetológicas (Sánchez *et al.*, 2017). Muchas regiones de África, Asia y América Latina se dedican a la producción de cacao. En el continente africano, Costa de Marfil es el mayor productor, seguido de Ghana, Camerún y Nigeria. Por su parte, en Asia, se destaca Indonesia y en América Latina Ecuador, Brasil, Perú, República Dominicana y Colombia, quien se ubica en el décimo lugar (ICCO, 2021) (Fig. 4).

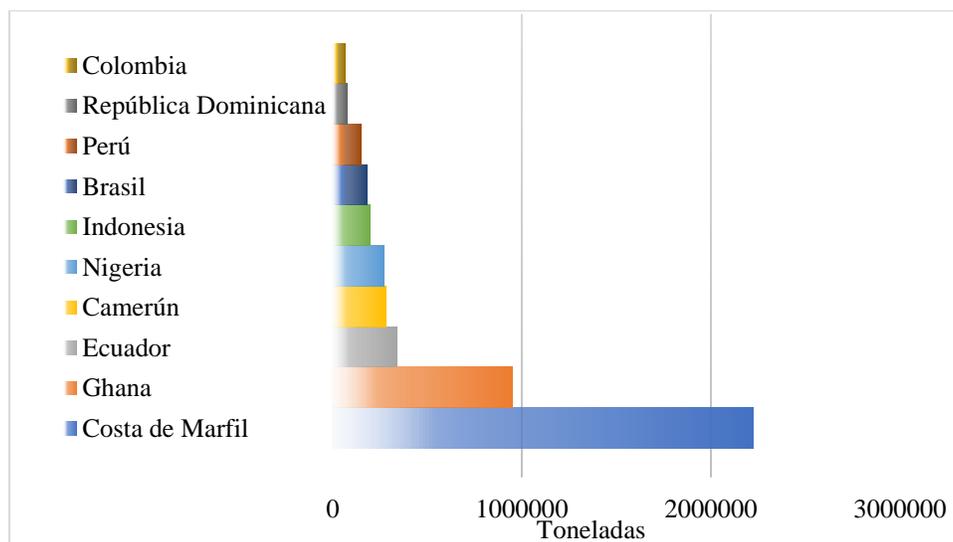
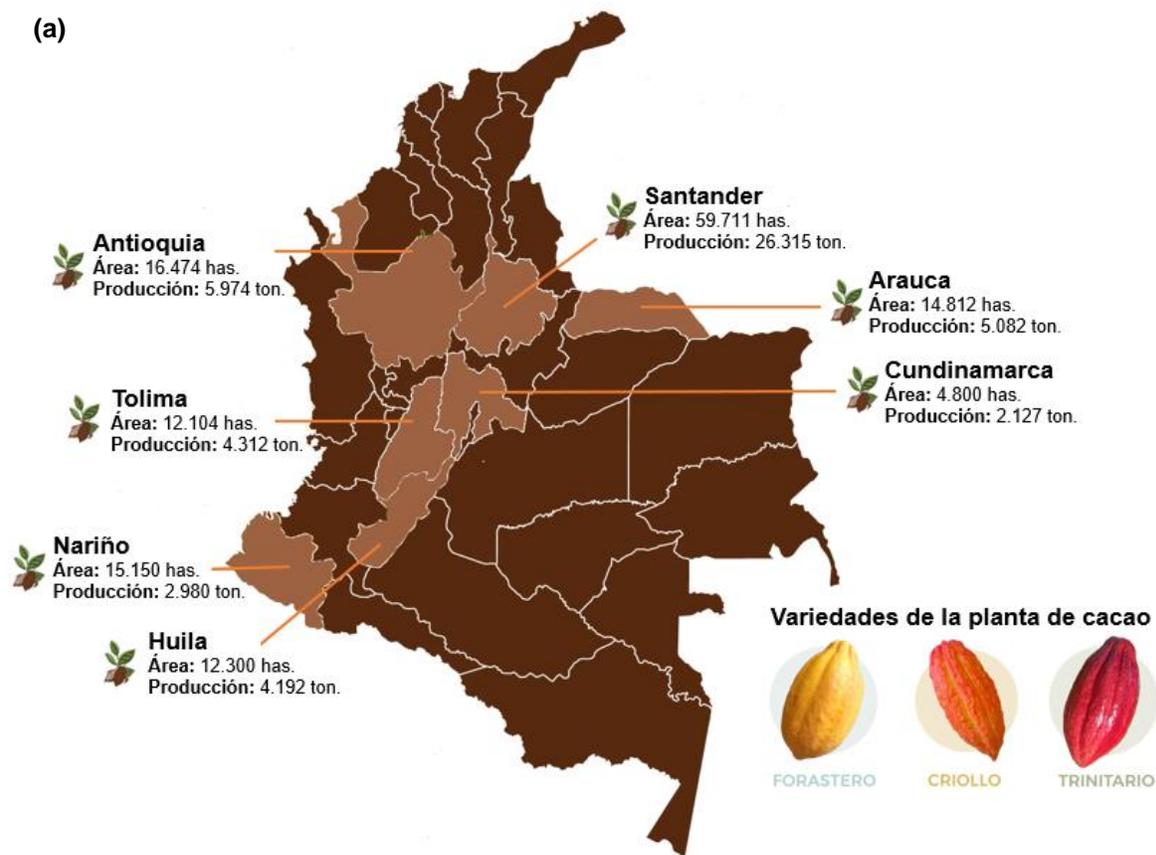


Figura 4. Principales países productores de grano de cacao. Tomado de ICCO (2021).

En Colombia, el cacao es un cultivo de gran importancia para la agricultura, pues ocupa el segundo lugar en el ranking nacional, después del café (Feola *et al.*, 2015). Durante el periodo comprendido entre los años 2020 al 2021 se produjeron aproximadamente 70.205 toneladas de grano de cacao (FEDECACAO, 2021). Santander se destaca por ser el departamento con mayor producción (41%) a nivel nacional, seguido de Antioquia (9%), Arauca (8%), Huila (8%), Tolima (7%), Nariño (5%) y Cundinamarca (3%) (FEDECACAO, 2021) (Fig. 5a). En Cundinamarca, para el año 2020, se estimó una producción de 2.127 toneladas que contribuyeron al mejoramiento de la economía regional y al sustento de las más de 4.400 familias que se dedican a la siembra de este fruto (Plan Departamental de Extensión Agropecuaria – PDEA, 2020). En el departamento, municipios como Caparrapí, Yacopí y Sasaima se destacan por ser los mayores productores de cacao (Fig. 5b) (Plan Departamental de Extensión Agropecuaria – PDEA, 2020).

Dentro de las condiciones climáticas que favorecen los cultivos de árboles de cacao se encuentran: la temperatura (entre 23 y 28 °C), el gradiente de altitud (entre 400 a 1200 m por encima nivel del mar), la humedad relativa (entre 70 y 80%) y la precipitación anual (entre 1500–2500 mm) (Bravo *et al.*, 2018).



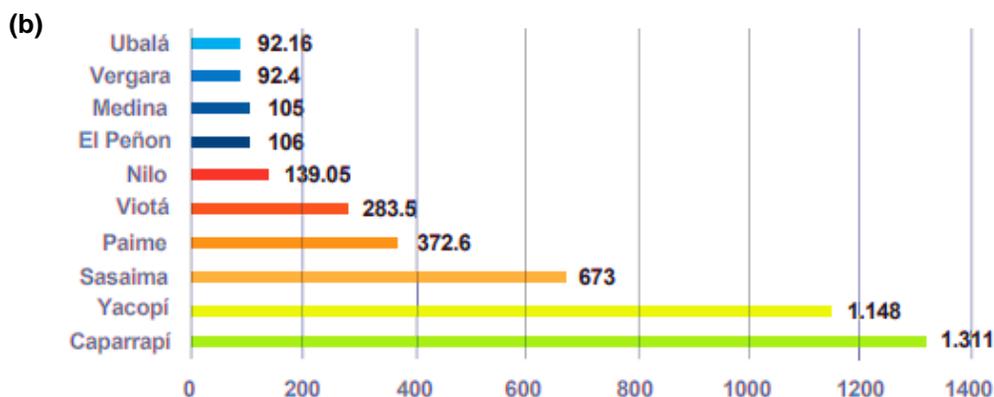


Figura 5. (a) Distribución por Departamento de las áreas sembradas con cacao en Colombia. Fuente: FEDECACAO, 2021 (b) Producción de cacao por municipio (toneladas/año). Tomado de: Plan Departamental de Extensión Agropecuaria- PDEA, 2020.

En la actualidad, existe una seria preocupación por la presencia de concentraciones elevadas de metales pesados en los tejidos de la planta de cacao, especialmente en el grano, porque pone en riesgo la salud humana y la productividad del cultivo (Maddela *et al.*, 2020). Se ha detectado la presencia y acumulación de Bi, As, Cd, Cr y Pb en los granos y cáscaras de las mazorcas de cacao, así como en los productos derivados (Maddela *et al.*, 2020). Chávez *et al.* (2015), realizaron un estudio en el sur de Ecuador, en donde determinaron como se distribuía el Cd en las diferentes partes de los árboles de cacao (hojas, granos y cáscaras). Los resultados indicaron que el Cd se acumula más en los granos (entre 0,02 y 3.00 mg·Kg⁻¹, con un valor medio de 0.94 mg·Kg⁻¹), seguido de la cáscara (entre 0,02 y 0,46 mg·Kg⁻¹ con un valor medio de 0,09 mg·Kg⁻¹) y las hojas (por debajo de 0,1 µg L⁻¹). Además, indicaron que la concentración de Cd en el grano se correlacionó estrechamente con el Cd disponible en el suelo. En Perú, Oliva *et al.* (2020), evaluaron las concentraciones de Cd en muestras de suelo, raíz, hoja, testa y cotiledón en 29 fincas cacaoteras de la provincia de Bagua, encontrando la mayor concentración media en hoja (2,53 mg·Kg⁻¹), suelo (1,7 mg·Kg⁻¹), raíz (1,6 mg·Kg⁻¹), cotiledón (0,99 mg·Kg⁻¹) y testa (0,49 mg·Kg⁻¹). En Colombia, Soler (2017), también evaluó la concentración de Cd en el tejido vegetal de plantaciones de cacao ubicadas en los municipios de Nilo y Yacopí. El orden de concentración de Cd en el tejido vegetal encontrado fue: hojarasca > hoja > testa y almendra. Más del 70% de los cultivos muestreados en ambos municipios produjeron almendras con contenidos de Cd mayor de 0.6 mg·Kg⁻¹. La concentración del metal en los diferentes tejidos de la planta está relacionado con diferentes factores, dentro de los que se encuentra: el genotipo de cacao cultivado (Arévalo-Gardini *et al.*, 2017; Barraza *et al.*, 2019; Lewis *et al.*, 2018), los sistemas de producción (Gramlich *et al.* 2017), los factores físicos y químicos del suelo, que pueden mantener el control de la movilización y bioacumulación de metales (Bravo *et al.*, 2014; Florida *et al.*, 2019; Pereira *et al.*, 2017), entre otros.

En América del Sur, se han detectado concentraciones de Cd hasta 12,56 mg·Kg⁻¹ en el cacao en polvo (Zug *et al.*, 2019), lo que ha generado una seria preocupación en los

agricultores, debido a que la Comisión Europea en el año 2014 estableció algunos límites máximos permitidos en los productos derivados del cacao para el consumo humano que entraron en vigor en el año 2019 (Tabla 2). En este reglamento se estableció que los productos a base de cacao, específicamente el polvo, no deben contener una concentración mayor a $0,6 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$. Debido a que el cacao en polvo es utilizado para preparar chocolate fino y que es ampliamente consumido por toda la población mundial. Por lo tanto, es de gran importancia, crear estrategias que reduzcan la absorción y acumulación de Cd por parte de la planta de cacao.

Tabla 2. Concentraciones máximas de Cd permitidas en productos derivados del cacao según la Comisión Europea.

Productos	Nivel máximo de Cd $\text{mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$
Chocolate con Leche con un contenido de materia seca total de cacao <30%.	0.10
Chocolate con un contenido de materia seca total de cacao <50%, chocolate con leche con un contenido de material seca total de cacao $\geq 30\%$.	0.30
Chocolate con un contenido de materia seca total de cacao $\geq 50\%$.	0.80
Cacao en polvo vendido al consumidor final o como ingrediente en cacao en polvo edulcorado vendido al consumidor final (Chocolate para beber).	0.60

Nota. Tomado de Zug *et al.* (2019).

5.2 COMUNIDAD BACTERIANA DEL SUELO

5.2.1 Función de la comunidad bacteriana en el suelo

El suelo es un recurso biológico natural no renovable involucrado en importantes funciones ecosistémicas y ciclos biogeoquímicos en la tierra. En este entorno habitan una amplia variedad de microorganismos (bacterias, arqueas, hongos y protistas) responsables de la mayoría de las transformaciones biológicas que contribuyen a la formación de nutrientes (Aislabie *et al.*, 2013). Los factores bióticos y abióticos, incluidos el pH del suelo, la temperatura, el tipo de suelo, las condiciones geográficas y climáticas, dan forma al microbioma del suelo a granel y rizosférico (Santoyo *et al.*, 2017).

Las bacterias, son los microorganismos más abundantes y diversos en el suelo (Gagelidze *et al.*, 2018). Estos microorganismos cumplen importantes funciones en dicho hábitat como la descomposición de la materia orgánica, los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, entre otros, y la estructura y fertilidad del suelo (Wei *et al.*, 2018). La descomposición es un proceso biológico que incluye la descomposición física y la transformación bioquímica de moléculas orgánicas complejas de material muerto en

moléculas orgánicas e inorgánicas más simples (Khatoon *et al.*, 2017). Los heterótrofos bacterianos y fúngicos dominan las comunidades de descomponedores microbianos. Los hongos actúan como degradadores primarios de carbono particulado y las bacterias actúan como recicladores rápidos de compuestos de materia orgánica (MO) rica en nutrientes simplemente estructurados (Fabian *et al.*, 2017). Por otra parte, el proceso de fijación del nitrógeno es llevado a cabo por las bacterias, quienes genéticamente codifican complejos enzimáticos de nitrogenasa formados por la proteína dinitrogenasa de hierro y molibdeno y la proteína dinitrogenasa reductasa de hierro o vanadio. En el proceso de nitrificación, las bacterias se encargan de convertir el amoníaco (NH_4^+) en nitrito (NO_2^-) y luego en nitrato (NO_3^-) y en el proceso de desnitrificación, permiten que el nitrato (NO_3^-) se convierta en óxido nitroso (N_2O) o dinitrógeno (N_2) (nitrógeno atmosférico) (Stein y Klotz, 2016). En cuanto a la estructura del suelo, el microbioma presente en él contribuye potencialmente en su proceso de agregación de varias formas a diferentes escalas. Las bacterias exudan biopolímeros que actúan como agentes aglutinantes para formar agregados a escala micrométrica, y por otra parte, los hongos, con ayuda de sus hifas, pueden enredar partículas para mantenerlas juntas (en escala micrométrica a milimétrica) (Lehmann *et al.*, 2017).

La rizosfera, definida por primera vez por el científico alemán Lorenz Hiltner (1904) y derivada de la palabra griega “Rhiza” que significa raíces (Brahmaprakash *et al.*, 2017), es la región del suelo influenciada por las raíces de las plantas donde hay una interacción estrecha con los microorganismos (Bakker *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2022). En esta interfaz del suelo, el microbioma de la rizosfera puede promover la descomposición de la materia orgánica, la formación de humus y también, contribuye en la transformación y absorción de nutrientes por parte de la planta (Bonanomi *et al.*, 2016; Mendes *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2022).

Se ha descrito que en un suelo rizosférico típico hay hasta 10^9 células por gramo, que comprende hasta 10^6 taxones microbianos (Brahmaprakash *et al.*, 2017; Lakshmanan *et al.*, 2017). El aumento del número y las actividades microbianas en la rizósfera se debe principalmente a la liberación de grandes cantidades de carbono orgánico por parte de las raíces de las plantas (Bakker *et al.*, 2017). Se ha descrito que, en la rizósfera, existe una gran cantidad y variedad de géneros bacterianos (Ahemad y Khan, 2012; Brahmaprakash *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2022). El mayor número de bacterias ocurre en la profundidad de arado del suelo cultivable a una profundidad de hasta ~30 cm, en capas más profundas, su número se reduce gradualmente (Brahmaprakash *et al.*, 2017).

De acuerdo con el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (año 2015), las bacterias del suelo pertenecen predominantemente a los filos Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes y Acidobacteria; órdenes Pseudomonadales, Eubacteriales y Actinomycetales y a los géneros *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Achromobacter*, *Sarcina*, *Enterobacter*, entre otras, al igual que las bacterias de Myxobacteria pertenecientes a los géneros *Micrococcus*, *Chondrococcus*, *Archangium*, *Polyangium* y *Cytophaga*

(Raine *et al.*, 2015). *Arthrobacter* es la bacteria autóctona más común en el suelo y constituye del 2 al 60 % de la población total del microbioma del suelo; se caracteriza por su tendencia a formar ramificaciones y cocos (Brahmaprakash *et al.*, 2017). Se ha descrito que las Proteobacterias se consideran el filo bacteriano más abundante en la rizosfera debido a su capacidad de responder a fuentes lábiles de C, mostrando un rápido crecimiento y adaptación a las diversas rizosferas vegetales (Chaparro *et al.*, 2014). A las proteobacterias le siguen las acidobacterias, a las que se les ha atribuido un papel importante en el ciclo del C en los suelos debido a su capacidad para degradar la celulosa y la lignina (Lagos *et al.*, 2015). En relación con las actinobacterias, se han asociado con suelos supresores de enfermedades y su capacidad para aumentar la nodulación de raíces y promover el crecimiento de las plantas (Mendes *et al.*, 2011).

Los cambios físicos y químicos causados por la contaminación de un ecosistema ocurren rápidamente, afectando en gran medida la funcionalidad de los servicios del ecosistémicos (Wang *et al.*, 2021). Por ejemplo, los efectos negativos de los metales pesados sobre los microorganismos del suelo han sido ampliamente documentados (Fashola *et al.*, 2016; Jebril *et al.*, 2022). Metales como el Cd, el Cr y el Pb pueden causar un fuerte impacto en la estructura y función de la comunidad, afectando su diversidad y actividad metabólica (Beattie *et al.*, 2018; Deng *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2019). Las bacterias pertenecientes a los filos Proteobacteria, Acidobacteria y Bacteroidetes son los principales filos reportados en suelos contaminados con metales pesados (Qin *et al.*, 2020; Rogiers *et al.*, 2021). Las bacterias pueden contrarrestar los efectos tóxicos de los metales pesados a través de mecanismos de adsorción, oxidación y reducción (Girdhar *et al.*, 2022) y también mediante la salida activa de los iones usando bombas de eflujo (Khan *et al.*, 2022).

Se ha descrito que el Cd tiene un efecto mucho más tóxico sobre las bacterias Gram-positivas que sobre las bacterias Gram-negativas debido a la composición de la pared celular (Jebril *et al.*, 2022) y a los mecanismos usados para tolerar Cd. En las bacterias Gram-negativas, la pared celular se compone principalmente de peptidoglicano, fosfolípidos y lipopolisacáridos (LPS) (Jebril *et al.*, 2022; Khan *et al.*, 2022). Los LPS llevan carga negativa manteniendo así la pared celular de naturaleza aniónica general (Khan *et al.*, 2022). En las bacterias Gram-positivas, la pared celular constituye casi la misma cantidad de peptidoglicano y ácidos teicoicos (TA) y, a pH neutro, ambos llevan carga aniónica; sin embargo, son los TA (polímero lineal aniónico basado en fosfato) los que juegan un papel clave en la retención neta de carga negativa en la superficie bacteriana (Khan *et al.*, 2022). Principalmente debido a estos grupos funcionales aniónicos, las bacterias confieren capacidad de unión a metales, cautivando así los iones metálicos catiónicos (Cd^{2+}) mediante fisorción o quimisorción (Khan *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2022). Por tanto, las bacterias Gram-positivas parecen acumular concentraciones más altas de metales pesados en sus paredes celulares en comparación con las bacterias Gram-negativas (Biswas *et al.*, 2021). En cuanto a los mecanismos usados para sobrevivir en ambientes con altas concentraciones de Cd, las bacterias Gram-negativas, expulsan el Cd^{2+} y el Zn^{2+} mediante sistemas impulsados por

transportadores de la familia de resistencia-nodulación-división (RND) como el sistema Czc (tolerancia al Cd^{2+} , Zn^{2+} y Co^{2+}) (Sowmya y Hatha, 2017). En contraste, en las especies Gram-positivas, la eliminación de Cd^{2+} del interior de la célula está mediada, entre otras, por la bomba CadA, que actúa como ATPasa tipo P exportadora de Cd (Hryniewicz *et al.*, 2015; Sowmya y Hatha, 2017). Se han informado proteínas Mts (smt) en cianobacterias para determinar la tolerancia al Cd (Nanda *et al.*, 2019).

5.2.2 Mecanismos de tolerancia al Cd presente en las bacterias

Las altas concentraciones de metales pesados pueden afectar negativamente la comunidad bacteriana cambiando su estructura debido a una reducción de la biomasa total o a una disminución en el número de poblaciones específicas (Ahemad, 2012; Chu, 2018). Los efectos adversos del metal pesado en las bacterias se han relacionado con varios procesos a nivel celular dentro de los que se encuentra el reemplazo de grupos glutatión y sulfhidrilo, que forman parte de las proteínas, o grupos hidroxilo, que forman parte de los fosfolípidos por iones Cd, la producción de especies reactivas del oxígeno y la inactivación de las metaloproteínas (Fashola *et al.*, 2016; Jebriil *et al.*, 2022), lo que consecuentemente causa desnaturalización de las proteínas, alteración de la membrana celular, daño del ácido nucleico e inhibición de la división celular, las actividades enzimáticas y la transcripción (Fashola *et al.*, 2016; Salam *et al.*, 2020). La toxicidad del Cd en la célula depende de la composición de ácidos grasos y proteínas de su pared celular, además de la concentración de Cd.

Las bacterias mayor adaptadas han desarrollado mecanismos de tolerancia que les permitan sobrevivir a la toxicidad causada por los metales pesados (Abbas *et al.*, 2018; Chu, 2018; Osman *et al.*, 2019). Por lo tanto, la tolerancia se ha definido como la respuesta de las células a la perturbación ambiental causada por la contaminación y está relacionada con la activación de mecanismos protectores o adaptativos para sobrevivir a estos ambientes (Bravo & Braissant, 2021).

Dentro de los mecanismos de tolerancia que han desarrollado las bacterias para contrarrestar los efectos nocivos del Cd se destacan (Fig. 6):

- ✚ **Sustancias poliméricas presentes en la pared celular y el espacio extracelular (Biosorción):** Algunas bacterias tienen la capacidad de producir capas de exopolímeros alrededor de su superficie celular con las que logran evitar la entrada del metal pesado dentro de la célula, mediante su secuestro extracelular (biosorción superficial) a través de varios mecanismos que incluyen el intercambio de protones y la microprecipitación de metales (Jebriil *et al.*, 2020). Las sustancias poliméricas extracelulares se componen principalmente de carbohidratos, polisacáridos (ESP), ácidos grasos y algunas veces, ácidos nucleicos; estas sustancias generalmente se encuentran cargadas negativamente, lo que consecuentemente genera que la eficacia de la unión metal-exopolímero dependa directamente del pH. Dentro de sus funciones

se encuentra, la protección contra la desecación, la fagocitosis y el parasitismo, y también, contribuye a la formación de biopelículas (Al-Dhabi *et al.*, 2019).

Estudios previos infieren que la capacidad de biosorción por parte de algunos géneros bacterianos puede verse influenciada por la composición de los exopolisacáridos, especialmente por la presencia de sulfatos y ácido urónico, pues estos forman geles en presencia de iones metálicos y, por lo tanto, ayudan a eliminar el Cd de entornos contaminados (Sowmya & Hatha, 2017). Mathivanan y Rajaram (2014), aislaron bacterias de un ecosistema contaminado industrialmente y detectaron su tolerancia máxima al Cd. Sus resultados indicaron que el género *Pseudomonas sp.*, a diferencia de los géneros *Bacillus sp.*, *Enterobacter sp.*, *Aeromonas sp.* podía tolerar hasta 500 mg/L de iones Cd (II), y tener una capacidad de biosorción del 99% (100 mg/L Cd (II)). Por otra parte, Long y colaboradores (2021), demostraron que las cepas de *Microbacterium sp.* D2-2 y *Bacillus sp.* C9-3 exhibieron una capacidad máxima de biosorción de 222.22 y 163.96 mg de Cd²⁺ por gramo de biomasa respectivamente (pH: 5.0) y concluyeron que los principales sitios de unión al metal eran los grupos hidroxilo, carboxilo, carbonilo y amino en la biomasa de ambas cepas.

El papel clave de la producción de EPS es el secuestro de Cd, lo cual reduce la biodisponibilidad del metal en el suelo (Bravo & Braissant, 2021). Sin embargo, vale la pena mencionar, que el porcentaje de Cd adsorbido por algunas bacterias tolerantes (*P. putida*, *S. oneidensis*, *R. tropici* y *Agrobacterium sp.*) aumenta en función del pH (Kenney y Fein, 2011).

✚ **Sistemas de eflujo (Quimiosorción):** Los sistemas de eflujo se encargan de transportar los cationes metálicos desde el interior de la célula hacia el exterior a través de proteínas integrales ubicadas en la membrana celular, y por tanto, los secreta (Sowmya y Hatha, 2017). Estas proteínas transportadoras también son útiles para la expulsión de biocidas, antibióticos y otros agentes tóxicos (Abbas *et al.*, 2018).

En la tolerancia al Cd se han identificado tres sistemas de eflujo: los facilitadores de difusión de cationes (CDF), las ATPasas tipo P y los transportadores compuestos por miembros de la familia RND (Abbas *et al.*, 2018; Bravo & Braissant, 2021; Marrero-Coto & Coto-Pérez, 2010; Sowmya & Hatha, 2017).

Las ATPasas tipo P son una familia de proteínas de transporte que funcionan mediante la hidrólisis del ATP. Su mecanismo de acción se basa en la importación del sustrato desde el exterior o desde el periplasma al citoplasma (ATPasa tipo P importadora) o la exportación desde el citoplasma al periplasma (ATPasa tipo P exportadora). En este sentido, se relaciona a la ATPasa tipo P importadora con el transporte de macroelementos como el Mg (II) y de metales pesados y las ATPasas tipo P exportadoras con la detoxificación de los cationes de metales pesados a través de su eflujo (Abbas *et al.*, 2018; Bravo & Braissant, 2021). La

proteína CadA codificada en el plásmido *pI258* de *Staphylococcus aureus* es la ATPasa tipo P más estudiada en bacterias (Sochor *et al.*, 2011).

El transporte de metales llevado a cabo por los facilitadores de difusión de cationes (CDF) es dirigido por un gradiente de concentración quimiosmótico $\Delta\psi$, de pH o de potasio. El ion Zn (II) es el sustrato primario, pero también puede transportar iones Co (II), Ni (II), Fe (II) y Cd (II). En esta familia se destaca la proteína CzcD descrita ampliamente en la bacteria *C. metallidurans* CH34. Esta proteína fue inicialmente como un regulador de la expresión del sistema CzcCBA, sin embargo, estudios recientes indican que también confiere un pequeño grado de tolerancia a Zn(II), Co(II) y Cd(II) en ausencia del sistema CzcCBA, disminuyendo la concentración citoplasmática de estos (Marrero-coto & Coto-pérez, 2010; Osman *et al.*, 2019).

Las proteínas pertenecientes a la familia RND, han sido mayormente descritas en bacterias Gram-negativas (Sowmya y Hatha, 2017). Las proteínas RND actúan como sistemas de exportación impulsados por protones, donde la mitad de la proteína es un canal de sustrato y la otra mitad es un canal de protones, cooperando como un antiportador protón-sustrato. Las bombas de RND en conjunto con una proteína OMF (factor de membrana externa) y una MFP (proteína de fusión de membrana) forman un canal de envoltura trans que permite la extrusión del sustrato hacia la luz extracelular desde el citoplasma. Estas proteínas no solo están involucradas en la tolerancia a metales pesados, sino que también contribuyen en la resistencia a múltiples fármacos en las bacterias y en la desintoxicación de los inhibidores de betalactamasa (Osman *et al.*, 2019). Dentro de esta familia se destaca el transportador de bomba de eflujo CzcCBA (donde CzcA es la proteína RND, CzcC es la proteína OMF y CzcB es la proteína MFP) responsable de la desintoxicación de Zn^{2+} , Co^{2+} y Cd^{2+} (Zeng *et al.*, 2012).

- ✚ **Captura intracelular mediada por proteínas:** Las bacterias tolerantes al Cd también han adoptado la estrategia de unir el Cd con proteínas de unión intracelulares ricas en cisteína (metalotioneínas bacterianas). La función principal de las metalotioneínas es reducir las concentraciones de iones libres dentro del citoplasma y las proteínas de unión a cationes metálicos citoplasmáticos (actividad secuestrante y desintoxicante). La primera metalotioneína bacteriana conocida fue *smtA*, la cual se caracterizó inicialmente en *Synechococcus* PCC 7942, y después fue descrita en *Anabaena* PCC 7120, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* (Abbas *et al.*, 2018) y *Salmonella enterica* 43C (Khan *et al.*, 2016).

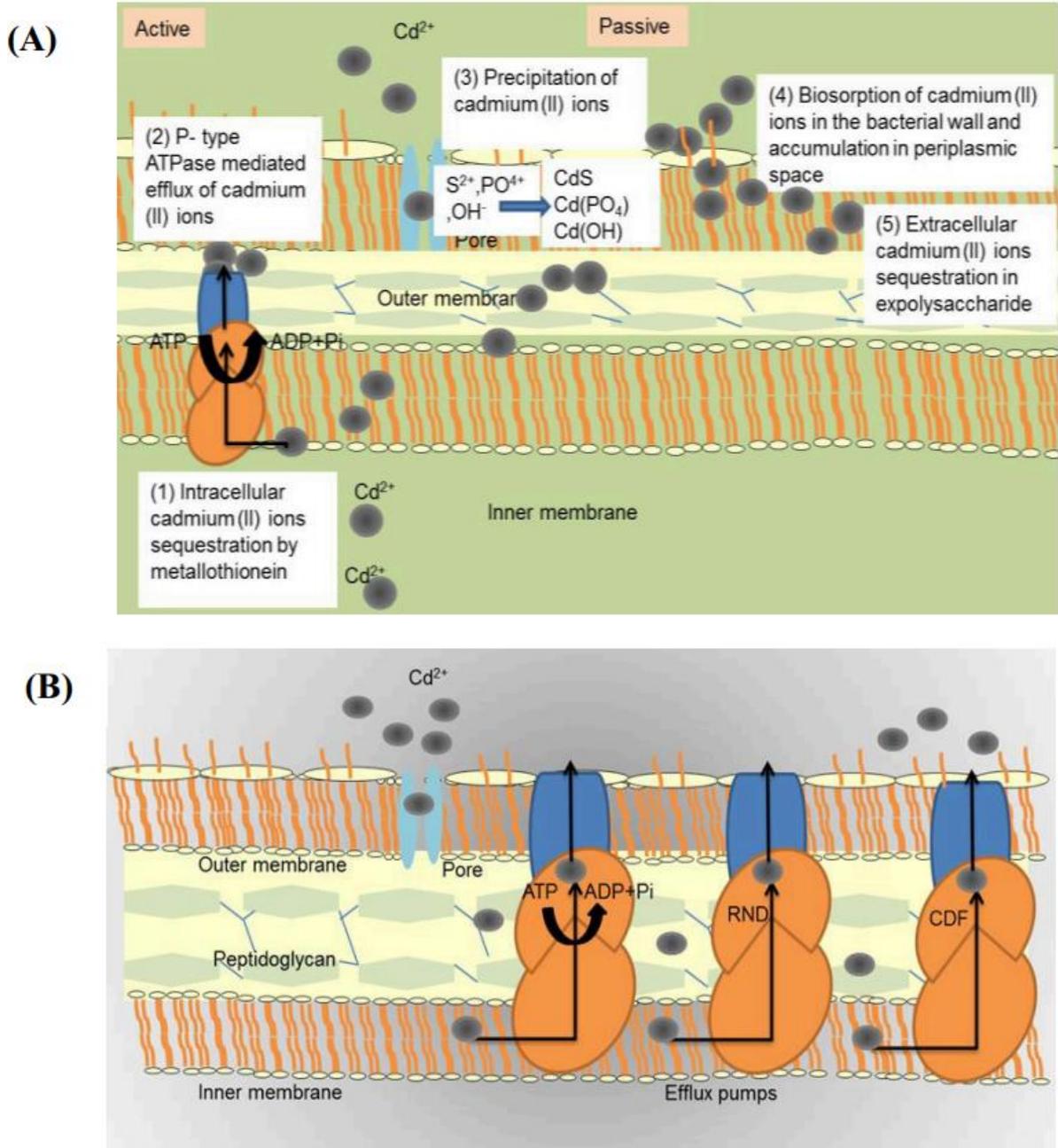


Figura 6. Representación esquemática de los mecanismos de tolerancia bacteriana a Cd. **(A)** Defensa bacteriana contra Cd. **(1)** Las bacterias pueden desactivar Cd mediante la unión con metalotioneína para facilitar el secuestro. **(2)** El transporte de Cd desde el citoplasma a los espacios extracelulares mediante bombas de eflujo. **(3)** el Cd se puede desactivar mediante la unión con S^{2-} , OH^- o PO_4^{3-} para facilitar la precipitación de Cd o **(4)** sustancias extracelulares fuera de las células para facilitar la adsorción de Cd en la pared bacteriana (intercambio iónico, formación de complejos y adsorción física). **(5)** La sustancia polimérica extracelular sirve para la unión de Cd. **(B)** Resistencia al Cd mediada por eflujo en bacterias. Cd entra en la célula a través de un transportador. Ante la presencia de transportadores de eflujo: ATPasa de tipo P, RND y CDF, los transportadores comienzan a bombear iones Cd hacia la célula exterior. Abreviaturas: ATPasa (trifosfato de adenosina), RND (división celular de nodulación de resistencia) y CDF (facilitador de difusión de cationes). Tomado de Jebril *et al.* (2022).

5.3 METODOLOGÍAS PARA ESTUDIAR LA COMUNIDAD BACTERIANA

Se ha descrito que las bacterias cumplen un importante papel en el ecosistema del suelo, y es por esta razón que se hace necesario estudiar su estructura y funcionamiento a nivel de comunidad, así como también, la variación en su composición debido a cambios provocados en su hábitat. Para ello, se han implementado varios métodos que contribuyen a la obtención de esta información que se clasifican de manera general en: métodos dependientes e independientes de cultivo.

5.3.1 Métodos dependientes de cultivo

Los métodos dependientes de cultivo se basan principalmente en el aislamiento y mantenimiento de las bacterias en medios líquidos, sólidos o semisólidos que les proporcionan los nutrientes necesarios para su crecimiento y posterior identificación (Salmonová *et al.*, 2017). Estos métodos son sensibles, económicos y proporcionan información cualitativa y cuantitativa de manera específica, diferenciando una bacteria o grupo poblacional de otro gracias al uso de medios de cultivo diferenciales (Fakruddin, 2013). Sin embargo, estos métodos presentan desventajas, dentro de las que se destaca principalmente la falta de información sobre los requerimientos nutricionales y fisiológicos de las bacterias para lograr su óptimo crecimiento, el riesgo de contaminación, entre otros (Mandal *et al.*, 2011). En la actualidad, menos del 1 % de las bacterias pueden cultivarse con los medios de cultivo actualmente disponibles (Salmonová *et al.*, 2017). A pesar de que los microorganismos cultivados representan solo una pequeña proporción de la diversidad microbiana en la naturaleza, el cultivo es esencial para aislar células bacterianas vivas en cultivo puro y determinar sus rutas metabólicas, por lo tanto, el cultivo sigue siendo una de las técnicas clave utilizadas en microbiología (Salmonová *et al.*, 2017; Uhlík *et al.*, 2013).

En Colombia, han sido varios los estudios realizados sobre la comunidad bacteriana cultivable presente en suelos cacaoteros con concentraciones variables de Cd. Por ejemplo, Bravo *et al.* (2018) aislaron ciento veintinueve bacterias del suelo tolerantes al Cd en 26 fincas ubicadas en Arauca, Boyacá y Santander. De ellos, 77 eran Gram-positivos y 47 Gram-negativos. En Antioquia, Córdoba- Novoa *et al.* (2021) aislaron y caracterizaron treinta morfotipos bacterianos diferentes de suelos con concentraciones naturales de Cd de los municipios de Yacopí y Nilo ubicados en el departamento de Cundinamarca utilizando medios de cultivo con $6 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ de Cd. Los morfotipos más abundantes con capacidad para tolerar Cd fueron Gram-negativos pertenecientes al filo Proteobacteria (90%) y casi la mitad de ellos mostraron capacidad para fijar nitrógeno, solubilizar fosfatos y degradar celulosa. Por otra parte, en Cundinamarca, Quiroga-Mateus *et al.* (2022) aislaron cinco cepas

bacterianas tolerantes al metal de los suelos recolectados; tres de ellas se obtuvieron de las capas superficiales del suelo (0 a 20 cm de profundidad), mientras que los dos aislamientos restantes correspondieron a las muestras tomadas en capas más profundas (20 a 40 cm de profundidad). Las cinco cepas aisladas en este estudio pertenecían al género *Bacillus sp.* dentro de los que se encontraron las especies *rugosus* y *aryabhattai*.

5.3.2 Métodos independientes de cultivo: Metagenómica

Debido a que solo una pequeña proporción de los microorganismos es cultivable (0.1%) se tiene información limitada sobre la comunidad microbiana que habita un ecosistema. Sin embargo, los avances que se han venido dando durante los últimos años en el campo de la biología molecular y en especial de las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) han proporcionado una alternativa prometedora para estimar la diversidad microbiana sin tener que aislar los microorganismos y de esta forma conocer el 99% restante (Hermans *et al.*, 2020).

El término “metagenómica” fue propuesto inicialmente por Handelsman *et al.* en el año 1998, y hacía referencia a “*los genomas colectivos de la microflora del suelo*”. Posteriormente fue definido por Cowan *et al.* (2004), y Allen y Banfield (2005) como “*el análisis funcional basado en la secuencia de los genomas microbianos colectivos que están contenidos en una muestra ambiental*” (Salmonová & Bunešová, 2017). Desde su primera aplicación, hasta la actualidad, la metagenómica, también conocida como genómica ambiental o comunitaria, se ha utilizado de manera integral para estudiar la diversidad microbiana en una determinada comunidad ambiental mediante el análisis de genes específicos, como el ARNr *16S* para bacterias, y el ARNr *18S* y las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS) del ribosoma para organismos eucariotas. Estos marcadores funcionan adecuadamente para la elaboración de perfiles filogenéticos debido a que están presentes de forma ubicua en la población, y a que tienen regiones hipervariables que diferencian los microbiomas a nivel de género, principalmente. Adicionalmente, estos marcadores están flanqueados por regiones conservadas que pueden ser el objetivo para diseñar cebadores "universales" (Kumar-Awasthi *et al.*, 2020).

El gen *16S* ARNr tiene una longitud aproximada de 1500 pares de bases e incluye nueve regiones variables (V1-V9) e hipervariables (H1-H9) intercaladas a lo largo de la secuencia *16S* altamente conservada (Ver Fig. 7) (Abellan-Schneyder *et al.*, 2021). La elección de regiones variables "óptimas" es un debate en curso que depende tanto de la tecnología de secuenciación disponible, la pregunta de investigación y la capacidad de comparar los resultados obtenidos para las comunidades microbianas recolectadas de diversos entornos por múltiples investigadores (Willis *et al.*, 2019). Generalmente, uno de los conjuntos de cebadores más utilizados para la investigación de la diversidad bacteriana en varios entornos, incluido el suelo, es el 341F/785R (dirigido a las regiones variables V3-V4 del gen *16S* RNAr) que fue desarrollado por Klindworth *et al.* (2013).

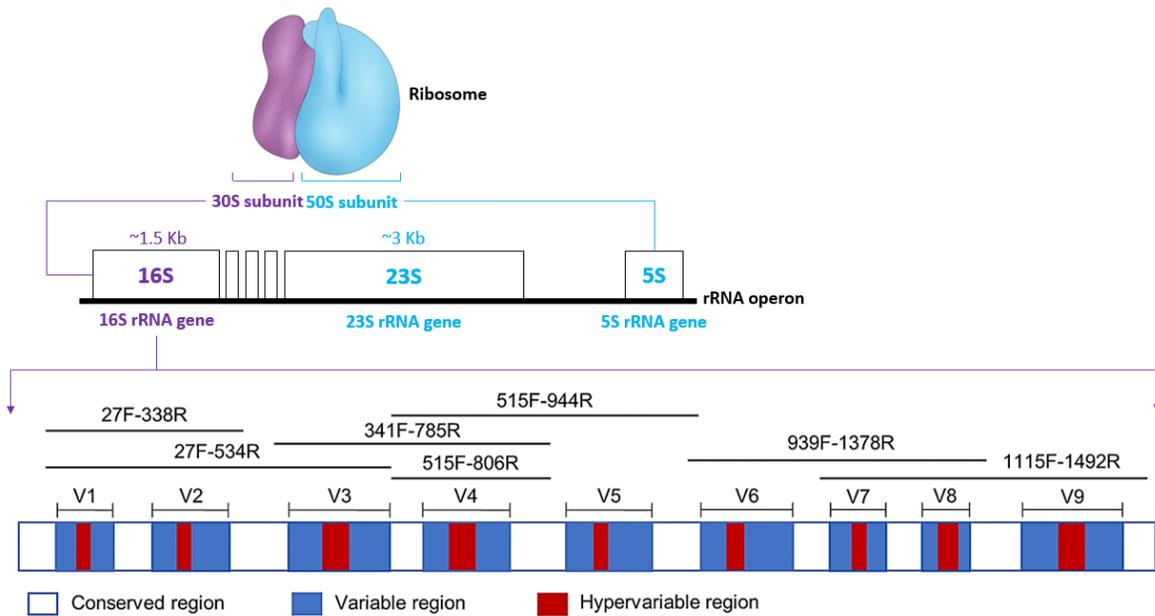


Figura 7. Representación esquemática del complejo ribosómico y el gen 16S ARNr y los diversos pares de cebadores utilizados para la secuenciación metagenómica. Las regiones conservadas se representan en blanco, las regiones variables en azul y las regiones hipervariables en rojo. Los cebadores están diseñados en una región conservada para obtener un producto de PCR que abarque una o más regiones hipervariables. Adaptado de Abellan-Schneyder *et al.* (2021).

La metagenómica se divide en dos áreas de investigación. La primera se basa en la amplificación de un gen determinado presente en una muestra objetivo y su posterior secuenciación (secuenciación de amplicón o metataxonómica) y la segunda en la secuenciación de todo el ADN genómico presente en una muestra, es decir de todos los genes sin realizar una amplificación previa (metagenómica “escopeta” o shotgun). Independientemente de la estrategia, se debe hacer una extracción y purificación del ADN total de la muestra problema, una preparación de librerías metagenómicas a partir de los productos amplificados o del ADN total extraído, secuenciación y análisis de los datos. Los resultados obtenidos proporcionarán información genética valiosa con respecto a la diversidad y predicción funcional de los microorganismos presentes en la muestra objetivo (Salmonová y Bunešová, 2017).

5.3.3 Procesamiento de datos de secuenciación de amplicón.

El paso inicial del procesamiento de los datos obtenido de la secuenciación de las librerías metagenómicas es el filtrado y la eliminación de las bases de baja calidad, adaptadores, dímeros de cebadores, entre otros; a este proceso se le denomina limpieza de las secuencias (Hugerth y Andersson, 2017). FastQC (Andrews, 2009) o MultiQC (Ewels *et al.*, 2016) son los programas bioinformáticos que se pueden utilizar para evaluar la calidad de los datos

antes y después del filtrado de calidad, incluso si los errores se distribuyen aleatoriamente o se agrupan en ciertas bases o regiones de la celda de flujo (Hugerth y Andersson, 2017). Luego, para lecturas de finales pareados, es común fusionarlas en sus regiones superpuestas (Liu *et al.*, 2021). El siguiente paso suele ser escoger las secuencias representativas como representantes de una especie (OTU—del inglés Operational Taxonomic Unit— y ASV—del inglés Amplicon Sequence Variant) (Liu *et al.*, 2021). El algoritmo UPARSE agrupa secuencias con un 97% de similitud en OTU (Edgar, 2013). Sin embargo, este método puede no detectar diferencias sutiles entre especies o cepas (Liu *et al.*, 2021). DADA2 (Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2 por sus siglas en inglés) es un algoritmo de eliminación de ruido desarrollado recientemente que genera ASV como secuencias representativas más exactas (Callahan *et al.*, 2016). Finalmente, se puede obtener una tabla de características (tabla OTU/ASV) cuantificando la frecuencia de las secuencias de características en cada muestra (Lucaciú *et al.*, 2019) y al mismo tiempo, a las secuencias de las características se les puede asignar una taxonomía, generalmente a nivel de reino, filo, clase, orden, familia, género y especie, lo que proporciona una perspectiva de reducción de la dimensionalidad del microbioma (Liu *et al.*, 2021) (Fig. 8). La asignación taxonómica se logra mediante la comparación directa de las secuencias obtenidas con secuencias de genes de ARNr 16S de genomas de referencia en una base de datos como SILVA (Quast *et al.*, 2012), Greengenes (De-Santis *et al.*, 2006), entre otras (Hugerth y Andersson, 2017).

Los datos obtenidos a partir de la secuenciación de los amplicones del gen 16S ARNr se utilizan para obtener información sobre la composición taxonómica de las muestras objeto de estudio (Liu *et al.*, 2021). No obstante, se han desarrollado varios paquetes de software útiles para predecir información funcional (Mongad *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2021). El principio detrás de esta predicción es vincular las secuencias de ARNr 16S o la información taxonómica con descripciones funcionales basadas en la literatura (Liu *et al.*, 2021). Por ejemplo, PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States por sus siglas en inglés) que se basa en la tabla OTU de la base de datos Greengenes (McDonald *et al.*, 2011) utiliza un algoritmo de reconstrucción de estado ancestral extendido para predecir qué familias de genes están presentes y luego combina familias de genes para estimar el metagenoma compuesto (Langille *et al.*, 2013). El algoritmo utiliza un árbol filogenético de secuencias de genes 16S rRNA para vincular las OTU con contenido genético. Por lo tanto, las predicciones de PICRUSt dependen de la topología del árbol y la distancia al siguiente organismo secuenciado. Debido a que siempre existe un vecino más cercano dentro de la topología de árbol, PICRUSt vincula todas las OTU, incluso si las distancias son grandes (Abhauer *et al.*, 2015; Langille *et al.*, 2013). Por otra parte, en Tax4Fun (Abhauer *et al.*, 2015), la vinculación de las secuencias del gen 16S ARNr con la anotación funcional de los genomas procariontes secuenciados se realiza con una identificación de vecino más cercano basada en una similitud mínima de secuencia de 16S ARNr (Abhauer *et al.*, 2015). Tax4Fun puede predecir las capacidades funcionales KEGG

(Enciclopedia de Kyoto of Genes and Genomes por sus siglas en inglés) (Kanehisa y Goto, 2000) de los microbiomas según la base de datos SILVA (Quast *et al.*, 2012).

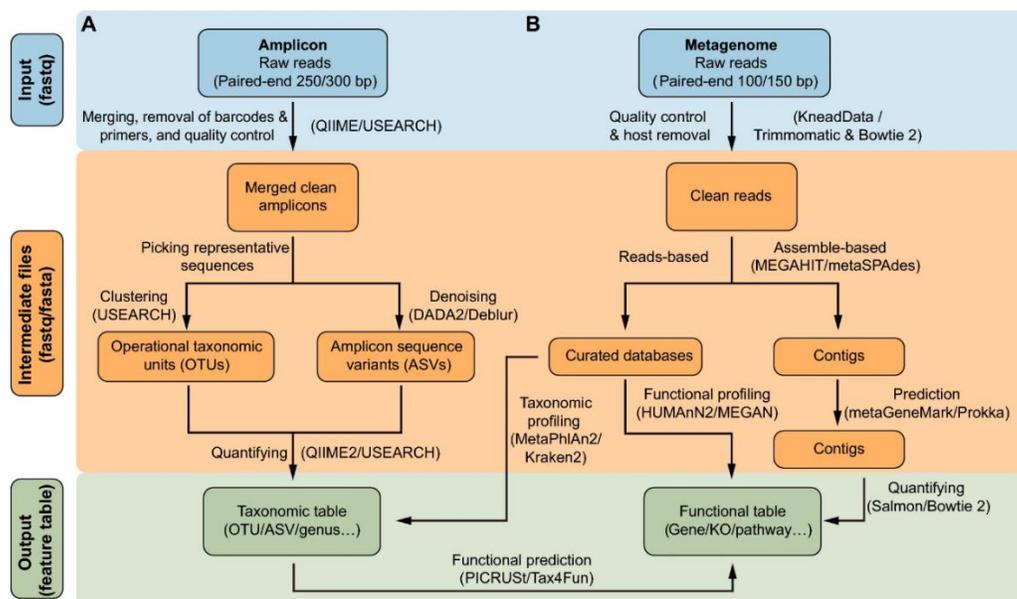


Figura 8. Flujo de trabajo de los métodos comúnmente utilizados para la secuenciación de amplicón (A) y metagenómica (B). Los bloques azul, naranja y verde representan archivos de entrada, intermedios y de salida, respectivamente. El texto junto a la flecha representa el método, con el software de uso frecuente que se muestra entre paréntesis. Las tablas taxonómicas y funcionales se conocen colectivamente como tablas de características. Tomado de Liu *et al.* (2021).

5.3.4 Análisis de diversidad, abundancia y predicción funcional.

La diversidad biológica o biodiversidad, se define como la variabilidad entre organismos vivos significativamente diferentes y su abundancia en un conjunto o comunidad presente en un ecosistema, incluido el terrestre, el marino y el acuático (Breitwieser *et al.*, 2018; Hermans *et al.*, 2020).

La diversidad microbiana comprende tres niveles de estudio de la diversidad biológica: diversidad genética dentro de las especies, número de especies y la diversidad comunitaria a nivel de ecosistema (ecológica) (Hermans *et al.*, 2020). El término diversidad de especies está constituido principalmente por dos componentes, el primero de ellos hace referencia al número total de especies presentes en un ecosistema dado (riqueza de especies) y el segundo a la distribución de los individuos entre estas especies (uniformidad o equidad de especies) (Hermans *et al.*, 2020).

En el año 1972 Whittaker estableció tres enfoques para medir la diversidad de especies, denominados: diversidad alfa (α), diversidad beta (β) y diversidad gama (γ). La alfa, también llamada diversidad comunitaria hace referencia a la diversidad de especies dentro de un hábitat determinado (intracomunitario), e involucra dos componentes: riqueza de especies y uniformidad. La riqueza de especies se refiere al número de especies diferentes presentes en

un determinado nicho; por ejemplo, si hay más especies presentes en “A” que en “B”, “A” es más rica que “B” (Kim *et al.*, 2017). La forma más sencilla de medir la riqueza microbiana es contar cuántas especies, representadas por unidades taxonómicas operativas (OTU) o variantes de secuencia de amplicón (ASV), se observan dentro de una muestra (Li *et al.*, 2022). Por otra parte, la uniformidad hace referencia al tamaño (abundancia relativa o absoluta) de la población de cada una de las diferentes especies que se encuentran presentes (Kim *et al.*, 2017). En general, cuando aumenta la riqueza y la uniformidad de las especies, también lo hace la diversidad (Kim *et al.*, 2017). Por su parte, la diversidad beta es definida como la diferencia en la composición de especies entre hábitats o comunidades que se encuentran en áreas distintas, y la diversidad gama es la medida que representa la riqueza total de especies a nivel de paisaje, en la que se involucran tanto las diversidades alfa como las beta (Agrawal *et al.*, 2011; Thukral, 2017).

Para evaluar y comparar la diversidad de las comunidades microbianas a partir de diferentes muestras, se han desarrollado una variedad de medidas ecológicas y herramientas bioinformáticas (Kim *et al.*, 2017). En lo que respecta a diversidad alfa, el cálculo de la riqueza total puede tener dos enfoques: el primero es un enfoque asintótico basado en estimadores de riqueza de especies. Por ejemplo, algunos indicadores infieren la riqueza teniendo en cuenta las especies raras presentes en la cola de la distribución de la abundancia, como Chao1, ACE y abundancia-Jack1 (Estimador de cobertura basado en la abundancia) que podría clasificarse en una evaluación basada en el individuo (Li *et al.*, 2022). El segundo es un enfoque no asintótico basado en rarefacción y extrapolación. Se ha propuesto y recomendado la rarefacción basada en el tamaño de la muestra y la extrapolación de la riqueza de especies, que se pueden enrarecer a muestras de tamaño pequeño o extrapolar a muestras de gran tamaño (Li *et al.*, 2022).

En los análisis de diversidad de la comunidad microbiana, no existe un acuerdo general sobre qué índice de diversidad es el mejor para usar (Kim *et al.*, 2017). Sin embargo, se ha recomendado el uso de los índices de diversidad de Shannon-Weaver y Simpson para medir de forma robusta la alfa diversidad microbiana (Haegeman *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2017). A pesar de que ambos índices contemplan la riqueza y abundancia de especies, tienen sesgos específicos. El índice de Shannon-Weaver otorga mayor peso a la riqueza de especies, mientras que el índice de Simpson considera la uniformidad de las especies más que la riqueza de especies en su medición (Kim *et al.*, 2017).

Tabla 3. Medidas de diversidad ecológica comúnmente utilizadas en estudios de ecología microbiana.

Índices de diversidad	Descripción	Fórmula
Índice de diversidad de Shannon (H)	Estimador de riqueza de especies y equidad de especies: más peso en la riqueza de especies.	$H = -\sum_{i=1}^s (p_i \ln p_i)$ <p>donde “s” es el número de OTU y “p_i” es la proporción de la comunidad representada por OTU “i”.</p>
Índice de Simpson (D)	Estimador de la riqueza de especies y la uniformidad de las especies: más peso en la uniformidad de las especies.	$D = \frac{1}{\sum_{i=1}^s p_i^2}$ <p>donde “s” es el número total de especies en la comunidad y “p_i” es la proporción de la comunidad representada por OTU “i”.</p>
ACE	Estimador de cobertura basado en la abundancia de la riqueza de especies.	$S_{ACE} = S_{abund} + \frac{S_{rare}}{C_{ACE}} + \frac{F_1}{C_{ACE}} \gamma_{ACE}^2$ <p>donde “S_{abund}” y “S_{rare}” son el número de OTU abundantes y raras, respectivamente, “C_{ACE}” es el estimador de cobertura de abundancia de la muestra, “F_1” es la frecuencia de singletons, y “γ_{ACE}^2” es el coeficiente de variación estimado para OTU raros. El coeficiente de variación estimado (γ_{ACE}^2) se define como:</p> $\gamma_{ACE}^2 = \max \left[\frac{S_{rare}}{C_{ACE}(N_{rare})(N_{rare}-1)} \sum_{i=1}^{10} i(i-1)F_i - 1, 0 \right]$
Chao1	Estimador de riqueza de especies basado en la abundancia.	$S_{Chao1} = S_{obs} + \frac{F_1(F_1-1)}{2(F_2+1)}$ <p>donde “F_1” y “F_2” son el conteo de singletons y doubletons, respectivamente, y “S_{obs}” es el número de especies observadas.</p>

Nota. Tomado de Kim *et al.* (2017).

En el suelo, la diversidad microbiana es alta. Una muestra típica de dicho ecosistema contiene miles de taxones individuales de Bacterias, Arqueas y Hongos. Se ha estimado que puede haber más de 10^6 OTU a nivel de especie (Jurasinski *et al.*, 2009). Para caracterizar estructural y taxonómicamente dicha diversidad microbiana, las técnicas de alto rendimiento,

como la secuenciación del gen 16S ARNr y los métodos de análisis de datos se han convertido en herramientas útiles y novedosas (Li *et al.*, 2022).

5.4 ESTUDIOS METAGENÓMICOS EN SUELOS CACAOTEROS CON Cd.

La metagenómica ha sido aplicada en varios estudios de suelos contaminados con Cd (Tabla 5). Las comunidades bacterianas son un componente importante del suelo que se ve afectado por la presencia de Cd (Guo *et al.*, 2017, Sun *et al.*, 2022). Varios estudios han demostrado que el metal afecta significativamente la diversidad y composición microbiana del suelo (Luo *et al.*, 2019; Salam *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2022). Por ejemplo, Luo *et al.*, (2019) determinaron que el porcentaje de abundancia de algunos filos bacterianos variaba con relación a la concentración de Cd presente en el suelo, observando un aumento en la abundancia del filo Actinobacteria (tolerante al Cd) y una disminución en los filos Proteobacteria, Verrucomicrobia y Nitrospirae (sensibles al Cd) a medida que aumentaba la concentración del metal; lo que indicó que los sitios con niveles altos de Cd tenían índices de diversidad más bajos que los grupos con niveles bajos. Sus resultados coinciden con los obtenidos por Salam *et al.*, (2020) y Sun *et al.*, (2022). En la **Tabla 5** se presenta un resumen de los principales estudios basados en el uso de la metagenómica para el análisis de suelos contaminados con Cd.

Tabla 5. Estudios basados en el uso de metagenómica como herramienta para el análisis de suelos contaminados con Cd.

Estudio	Lugar	Técnica	Cebadores utilizados	Método de secuenciación	Referencia
Metagenómica integrada y análisis de redes ecológicas moleculares de la composición de la comunidad bacteriana durante la fitorremediación de suelos contaminados con cadmio por cultivos bioenergéticos.	Nanyang, China.	Metataxonómica.	Region V3-V4 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')	Illumina MiSeq.	Chen <i>et al.</i> (2017).
Análisis metagenómico de la comunidad microbiana y la función involucrada en suelos contaminados con Cd.	Shuangsheng, China.	Metagenómica.	-	Illumina cBot.	Feng <i>et al.</i> (2018).
La exposición al cadmio y las interacciones de plantación de <i>Sedum alfredii</i> dan forma a la comunidad bacteriana en la rizosfera de la planta hiperacumuladora.	Quzhou, China.	Metataxonómica.	Region V3-V4 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')	Illumina MiSeq.	Hou <i>et al.</i> (2018).

Respuesta de la comunidad bacteriana a la contaminación por cadmio del suelo de arroz agrícola.	XiangTan, China.	Metataxonómica.	Region V4 515F (5'-GTGCCAGCMGCGGTAA-3) 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3)	Illumina MiSeq.	Luo <i>et al.</i> (2019).
Efectos de la perturbación del cadmio en la estructura de la comunidad microbiana y resistoma de metales pesados de un suelo agrícola tropical.	Ilorin, Nigeria.	Metagenómica.	–	Illumina MiSeq.	Salam <i>et al.</i> (2020).
Caracterización y comparación de las comunidades bacterianas de la rizosfera y suelos a granel de campos de trigo contaminados con cadmio.	Xushe, China.	Metataxonómica.	Region V3–V4 343F (5'-TACGGRAGGCAGCAG-3') 798R (5'-AGGGTATCTAATCCT-3')	Illumina MiSeq.	Song <i>et al.</i> (2020)
El crecimiento de las plantas y la comunidad bacteriana autóctona se vieron significativamente afectados por la contaminación con cadmio en el sistema suelo-planta.	Hunan, China.	Metataxonómica.	Region V5-V6 799F (5'-AACMGATTAGATACCKG-3') 1115R (5'-AGGGTTGCGCTCGTTG-3')	Illumina MiSeq.	Du <i>et al.</i> (2021).
Identificación de microorganismos resistentes al Cd a partir de suelo contaminado con metales y su potencial para promover el crecimiento y la acumulación de Cd en bermudagrass.	Zhuzhou, China.	Metataxonómica.	Region V3-V4 338F (5'-barcode + ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')	Illumina MiSeq.	Xie <i>et al.</i> (2021).
Impacto de la contaminación por cadmio en la estructura de la comunidad bacteriana del suelo cultivable y el aislamiento de bacterias resistentes al cadmio.	Xiangtan, China.	Metataxonómica.	Region V3-V4 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')	Illumina MiSeq.	Yu <i>et al.</i> (2021).
Efectos de la contaminación por cadmio en las comunidades bacterianas y fúngicas en el suelo de cultivo de <i>Panax ginseng</i>.	Changchun, China	Metataxonómica.	–	Illumina HiSeq.	Sun <i>et al.</i> (2022).

Nota. Tabla realizada por la autora.

En Colombia, los estudios basados en la identificación molecular de la comunidad bacteriana cultivable y no cultivable presente en suelos cacaoteros contaminados con Cd son pocos. Se destaca el realizado por Cáceres *et al.* (2021), cuyo objetivo fue examinar la composición

taxonómica de la comunidad microbiana y sus posibles relaciones con las propiedades fisicoquímicas del suelo utilizando métodos dependientes e independientes de cultivo (secuenciación de amplicón del gen 16S ARNr). En este estudio, los filos que se destacaron en todas las muestras fueron: Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Myxococcota, Chloroflexi, Planctomycetes, Bacteroidetes, Gemmatimonadetes, Nitrospira, Firmicutes y NB1_J; y los géneros *Nitrospira*, *Udaeobacter*, *Haliangium*, *Cupriavidus*, *MND1*, *Bacillus*, *Kitasatospora*, *Niveibacterium*, *Acidothermus*, *Burkholderia*, *Acidibacter*, *Terrimonas*, *Gaiella*, *Solibacter*, *Kitasatospora*, *Sphingomonas*, y *Streptomyces*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Descripción del sitio y diseño del muestreo

El muestreo se realizó en el municipio de Yacopí, Cundinamarca (5° 27' 58" N y 74° 20' 20" O). Esta región presenta climas de bosque húmedo premontano tropical (precipitaciones entre 1000 y 2000 mm/año) y bosque muy húmedo premontano tropical (precipitaciones entre 2000 y 4000 mm/año) con temperaturas entre 18 °C y 24 °C (EOT Yacopí, 2005). Con base en el estudio realizado por Rodríguez Albarracín (2019) se seleccionaron tres fincas cacaoteras con diferentes concentraciones naturales de Cd total (Cdt) > 5 mg·Kg⁻¹ (F1) y < 2 mg·Kg⁻¹ (F2 y F3). La selección de los sitios de muestreo en cada finca se realizó por medio del método hipercubo latino condicionado (McKay *et al.*, 1979; Minasny & McBratney, 2006) con corrección en campo. En cada finca se seleccionó un lote cultivado con el mismo genotipo de cacao (CCN 51) en etapa productiva (designado como suelo con cacao, SCC) y un lote sin cultivo de cacao (designado como suelo sin cacao, SWC). En el lote con cultivo de cacao se seleccionaron tres puntos de muestreo por finca. En cada punto, se seleccionaron tres árboles y se colectaron cuatro submuestras de suelo de aproximadamente 0,5 kg por árbol a una profundidad de 0 a 30 cm (D1) y a 31 a 100 cm (D2). Las submuestras fueron mezcladas para obtener una mezcla compuesta por punto de muestreo (una réplica biológica, en total se realizaron tres réplicas por lote). Adicionalmente, se tomaron tres muestras de suelo rizosférico (RZ) en F1 y F2. En los lotes SWC de cada finca, también se seleccionaron tres puntos de muestreo para colectar suelo D1 y uno para D2. En total se colectaron 36 muestras de suelo, 24 para SCC y 12 para WC (Fig. 9). Una parte de las muestras de suelo previamente tamizado a través de un tamiz de 6.3 mm se almacenó en tubos falcon® de 50 ml en hielo seco y se llevó al laboratorio de Agrobiotecnología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia para la extracción del ADN total y el resto de las muestras se conservó a temperatura ambiente para realizar los análisis fisicoquímicos de los suelos y la determinación de los niveles de Cdt y Cd disponible (Cda) en el laboratorio de suelos y aguas de la misma Facultad. En la **Tabla 6** se describe el significado de las abreviaciones de las muestras de suelo usadas en el texto.

Tabla 6. Lista de las abreviaciones usadas en el texto.

Abreviación	Significado
F1CD1	Finca 1- Cultivo- Profundidad 1 (Farm 1-Crop-Depth 1)
F1CD2	Finca 1- Cultivo- Profundidad 2 (Farm 1-Crop-Depth 2)
F1CRz	Finca 1- Cultivo- Rizosférico (Farm 1-Crop-Rhizospheric)
F1WCD1	Finca 1- Sin Cultivo- Profundidad 1 (Farm 1-Without Crop-Depth 1)
F1WCD2	Finca 1- Sin Cultivo- Profundidad 2 (Farm 1-Without Crop-Depth 2)

F2CD1	Finca 2- Cultivo- Profundidad 1 (Farm 2-Crop-Depth 1)
F2CD2	Finca 2- Cultivo- Profundidad 2 (Farm 2-Crop-Depth 2)
F2CRz	Finca 2- Cultivo- Rizosférico (Farm 2-Crop-Rhizospheric)
F2WCD1	Finca 2- Sin Cultivo- Profundidad 1 (Farm 2-Without Crop-Depth 1)
F2WCD2	Finca 2- Sin Cultivo- Profundidad 2 (Farm 2-Without Crop-Depth 2)
F3CD1	Finca 3- Cultivo- Profundidad 1 (Farm 3-Crop-Depth 1)
F3CD2	Finca 3- Cultivo- Profundidad 1 (Farm 3-Crop-Depth 1)
F3WCD1	Finca 3- Sin Cultivo- Profundidad 3 (Farm 3-Without Crop-Depth 1)
F3WCD2	Finca 3- Sin Cultivo- Profundidad 3 (Farm 3-Without Crop-Depth 2)

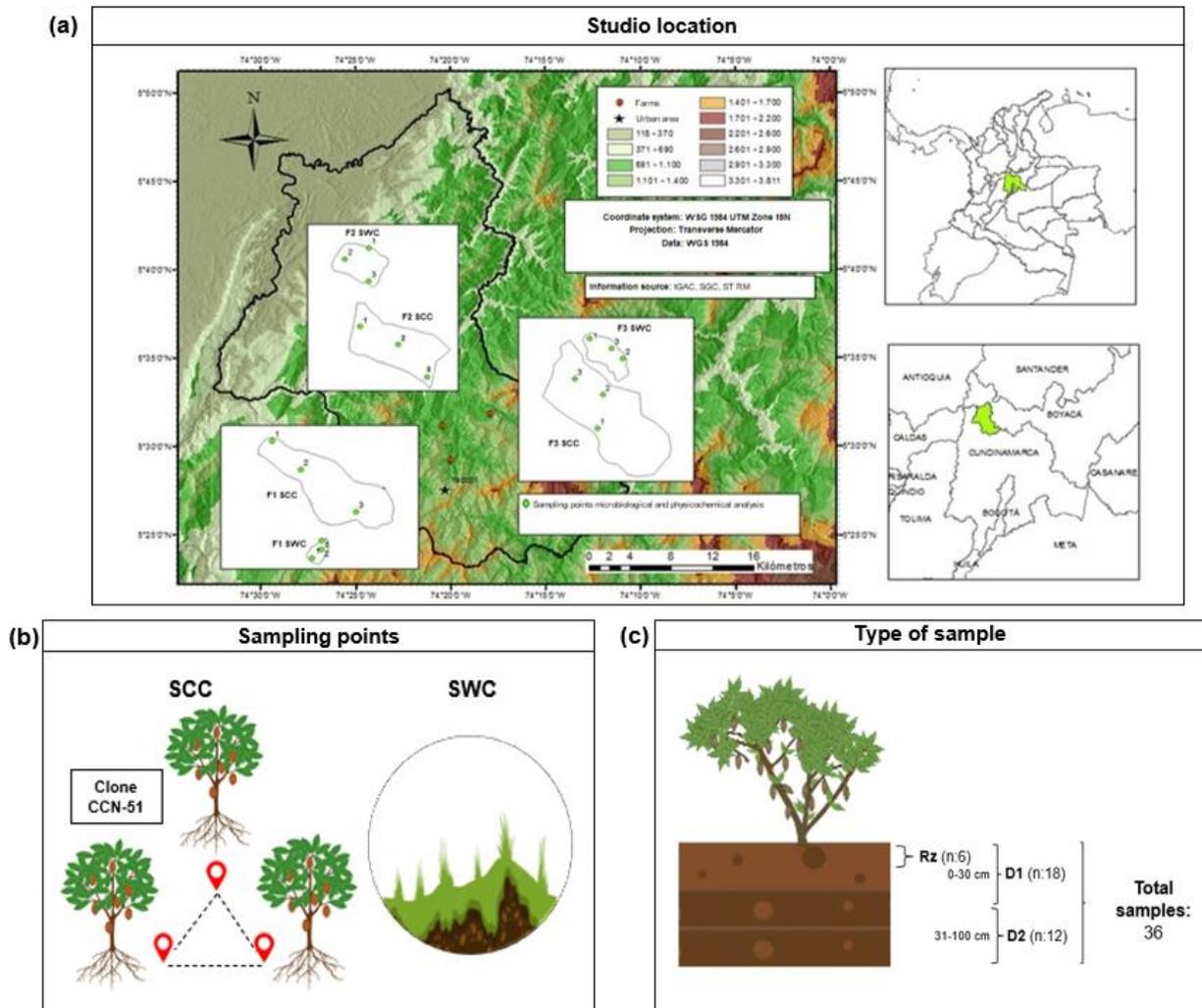


Figura 9. Descripción general del diseño de muestreo del suelo. **(a)** Ubicación geográfica de la zona de estudio en donde se visualizan las fincas evaluadas: Finca 1: F1; Finca 2: F2 y Finca 3: F3. **(b)** Puntos de muestreo de las fincas con cultivo (SCC) y sin cultivo (SWC). El triángulo representa la selección de tres árboles, cada uno

con una submuestra compuesta de suelo y la mezcla entre estas representa una réplica biológica. (c) Tipos de muestra colectada (Rz: suelo rizosférico; D1: 0-30 cm; D2: 31-100 cm); n=3 (número de réplicas biológicas por finca). Mapa realizado por Camilo Bustos Linares.

6.2 Análisis fisicoquímico de las muestras de suelo y determinación de Cdt y Cda.

Las propiedades de los suelos se determinaron a partir de los siguientes métodos: textura (método de Bouyoucos), pH en suspensión suelo: agua (relación peso: volumen 1:1), porcentaje de carbono orgánico (CO) (Walkley & Black), calcio (Ca), magnesio (Mg) y potasio (K) intercambiables (acetato de amonio 1M pH 7.0), Capacidad de Intercambio Catiónico Efectiva (CICE) (desplazamiento del NH₄ intercambiado con NaCl), manganeso (Mn), hierro (Fe), zinc (Zn), cobre (Cu) disponibles (extracción con DTPA) y fósforo (P) aprovechable (método de Bray II) (Rodríguez *et al.*, 2019).

La determinación de Cdt se realizó por extracción con agua regia (HCl:HNO₃–3:1) (Rodríguez *et al.*, 2019) y el Cda se determinó usando 0.05M DTPA (Chavez *et al.*, 2015; Rodríguez *et al.*, 2019). Estos ensayos se realizaron en el laboratorio de Suelos y Aguas de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá.

6.3 Extracción de ADN de suelos

La extracción de ADN de las muestras de suelo se realizó con el Kit DNeasy® PowerSoil® (Qiagen, Inc, Hilden, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y calidad del ADN total extraído se determinó utilizando el Kit Qubit™ dsDNA HS (Invitrogen™) y electroforesis en gel de agarosa al 0,9% (p/v), respectivamente (Salam *et al.*, 2020). El protocolo de extracción y cuantificación de ADN se describe en el **Anexo 1**.

6.4 Amplificación y preparación de librerías metagenómicas

La amplificación y preparación de librerías metagenómicas se realizó siguiendo la metodología propuesta por Faith *et al.*, (2013) en el laboratorio de Agrobiotecnología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá. Esta metodología emplea dos ciclos de PCR. La primera PCR se basó en el uso de cebadores degenerados que amplificaron la secuencia de la región V4 usando cebadores 515F y 806R unidos a secuencias adaptadoras que contenían una fase y una región de unión que fue reconocida por un nuevo conjunto de cebadores unidos a diferentes códigos de barras (66 - 71 nt). Estos nuevos cebadores se utilizaron en una segunda PCR para el multiplexado de las diferentes muestras.

La primera PCR se realizó en un volumen final de reacción de 25 μ l. La mezcla estuvo compuesta por 0,1 μ l de Platinum™ Taq DNA Polimerasa High Fidelity (Invitrogen Carlsbad, CA, EE. UU.), 0,75 μ l de MgSO₄ 50 mM, 2,5 μ l de tampón-Mg 10X, 0,2 μ l de dNTP 10 mM, 0,5 μ l (10 μ M) de cada uno de los cebadores (directo e inverso) unidos a secuencias adaptadoras, 2 μ l (25 ng) de muestra de ADN y 18,45 μ l de agua destilada ultrapura (Invitrogen Carlsbad, CA, EE. UU.). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 94 °C durante 45 segundos, 50 °C durante 60 segundos y 72 °C durante 90 segundos, terminando con un paso de extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Seguidamente, se verificó su calidad y concentración mediante el uso de geles de agarosa al 1,8% y con el fluorómetro Qubit (Invitrogen).

Los amplicones de la primera PCR previamente obtenidos se usaron como plantilla para una segunda ronda de amplificación. Este proceso se llevó a cabo agregando 5 μ l del producto de PCR, 1 μ l (10 μ M) de cada uno de los cebadores directo e inverso con códigos de barras, 0.1 μ l Platinum™ Taq DNA Polimerasa High Fidelity (Invitrogen Carlsbad, CA, EE. UU.), 1,5 μ l de MgSO₄ 50 mM, 2,5 μ l de tampón 10X, 0,5 μ l de dNTP 10 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) y 13,40 μ l de agua destilada ultrapura (Invitrogen Carlsbad, CA, EE. UU.). La segunda PCR se realizó bajo las mismas condiciones de reacción descritas anteriormente, a excepción de los ciclos (en este caso se usaron 12 ciclos). Los productos obtenidos tanto de la primera como la segunda PCR se purificaron con perlas AMPure XP (Beckman Coulter) utilizando una concentración de 0,8X (es decir, se adicionaron 8 μ l de perlas a 10 μ l de muestra). La concentración del amplicón y la verificación del tamaño del fragmento obtenido se realizó en un fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen) y en un analizador de fragmentos de ADN QSEP-100 (BioOptic) respectivamente, en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN)- Sede Bogotá. Cada muestra se ajustó a una concentración de 6 nM, y posteriormente, todas las muestras se mezclaron y secuenciaron en modo de extremo emparejado (2 \times 300 pb) utilizando un sistema MiSeq (Illumina, Inc.). El proceso de secuenciación se realizó en la Unidad de Genética y Resistencia Antimicrobiana de la Universidad El Bosque (UGRA)- Sede Bogotá. Los cebadores (directo e inverso) que se utilizaron en esta investigación, así como una breve descripción del protocolo de limpieza de las librerías metagenómicas y análisis de fragmento se presentan en el **Anexo 2**.

6.5 Procesamiento y análisis de secuencias

Los datos de las secuencias fueron inicialmente sometidos a control de calidad en FastQC v 0.11.9 (Andrews, 2010) y MultiQC v1.11 (Ewels *et al.*, 2016). Los adaptadores y las bases ambiguas (N) fueron eliminadas mediante Trimmomatic v0.39 (Bolger, Lohse y Usadel, 2014) y Sickle v1.33 (Joshi y Fass, 2011) respectivamente. Las secuencias obtenidas se procesaron en la plataforma Qiime2™-2021.11 (Bolyen *et al.*, 2019), donde Dada2 permitió

la eliminación de cebadores, la filtración de secuencias quiméricas y de baja calidad, además, el recorte de las lecturas a una longitud mínima de 230 pb. Todas las lecturas representativas se agruparon en variantes de secuencia de amplicón (ASVs) y se compararon con la versión 138 de la base de datos SILVA (ARNr 16S) utilizando un clasificador Naive-Bayes entrenado (NBC). Todos los ASVs que se asignaron taxonómicamente a las mitocondrias y los cloroplastos se eliminaron del conjunto de datos. La predicción del potencial funcional de las comunidades bacterianas identificadas se realizó con TAX4Fun (Aßhauer *et al.*, 2015). Las funcionales se asignaron utilizando la base de datos de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG) para generar tablas de conteo funcional por muestra (Kanehisa y Goto, 2000) (Anexo 3).

6.6 Análisis estadístico

Los valores de las propiedades fisicoquímicas y las concentraciones de Cdt y Cda de las muestras de suelo con relación a las variables: tipo de finca (F1, F2, F3), tipo de lote (con y sin cultivo de cacao) y tipo de muestra colectada (D1, D2 y Rz) se analizaron mediante las pruebas no paramétricas Kruskal- Wallis y Wilcoxon ($p < 0.05$). La significancia de las propiedades fisicoquímicas entre grupos (F1, F2 y F3) se evaluó mediante la prueba estadística no paramétrica Wilcoxon. Luego, se evaluó la correlación entre las propiedades que fueron significativas ($p = 0.01$) con el coeficiente de Spearman (relaciones lineales) en R Studio (v4.1.1).

Se estimaron los índices de Chao1, Shannon y Gini-Simpson para evaluar alfa diversidad y la distancia Unifrac ponderado para evaluar la diversidad beta de las diferentes muestras de suelo. Los índices de diversidad, la abundancia relativa y diferencial de taxones (LEfSe), el análisis de redundancia (RDA), las correlaciones de Spearman entre los taxones (abundancia relativa $> 5\%$), las vías metabólicas y las propiedades fisicoquímicas, incluida la concentración de Cd se realizaron en R Studio (v4.1.1) utilizando el paquete Microeco (v. 0.13.0) (Liu *et al.*, 2021).

7. RESULTADOS

7.1 *Análisis físicoquímico de los suelos y concentración de Cdt y Cda.*

Los suelos de F1 se caracterizaron por presentar texturas francas a arcillosas, mientras que en F2, las muestras correspondientes a RZ y D1 con cultivo (SCC) se clasificaron como franco-arcillosas y las muestras de D2 como franco-arcillo-arenosas. En lo que respecta a las muestras sin cultivo (SWC), F2WCD1 se caracterizó por presentar textura franca y F2WCD2 franco-limosa. Por otra parte, en F3 los suelos D1 (SCC) se clasificaron como franco-arenosa, D2 (SCC) como franco-arcillo-arenosa y SWC (D1 y D2) como areno-francosa (Anexo 4).

Las muestras de suelo de F1 presentaron mayores valores de CICE, Ca, Cu, Mn y Zn ($p < 0.05$) en comparación con F2 y F3. En lo que respecta a las muestras de F2, el N se caracterizó por ser significativamente menor ($p < 0.05$) respecto a F1 y F3; y las muestras de F3 se caracterizaron por tener alto contenido de P y CO y bajo contenido de arcillas. Por otra parte, en los suelos con cultivo (SCC) se obtuvieron valores más altos de Ca, Mg y K en comparación con los suelos sin cultivo (SWC). En estos últimos se detectó un mayor contenido de CO en las muestras de F2 y F3 (Anexo 4). La comparación entre profundidades mostró que el suelo rizosférico se caracterizó por tener valores más altos de Ca, Mg, K, CICE y CO respecto a D1 y D2. Por otra parte, el contenido de Ca, Mg, K, N y CO fue mayor en la superficie (D1), con excepción del Ca en F1 (Anexo 4).

La concentración de Cdt en el suelo varió entre las tres fincas ($p < 0.05$), encontrándose un valor promedio para F1 de 6,68, F2 de 1,63 y F3 de 3,41. En lo que respecta a las muestras con cultivo, F1 presentó diferencias con F2 y F3, sin embargo, estas dos últimas no presentaban diferencias entre sí. Por otra parte, en las muestras sin cultivo, F3 presentó diferencias con F1 y F2. La comparación entre el suelo RZ y a dos profundidades mostró que el suelo rizosférico de F1 es diferente a D1 y D2 para ambos suelos con y sin cultivo (SCC y SWC); en contraste, los suelos F2 y F3 solo presentaron diferencias en suelos sin cultivo para D1. Adicionalmente, el suelo D2 (SCC) de F1 presentó diferencias con los suelos D2 (SCC) de las demás fincas. Al igual que el Cdt, el Cda fue significativamente mayor en F1 con respecto a F2 y F3, quienes no presentaron diferencias estadísticas entre sí. También se observó el mismo comportamiento del Cda en los suelos con cultivo ($F1 > F2-F3$). En las muestras sin cultivo (SWC) se observó que F3, presentó diferencias estadísticamente significativas con F2, pero no con F1. La comparación entre tipo de muestra colectada reveló que en F1 el suelo rizosférico tiene mayor contenido de Cda en la rizosfera que F2 y que F1CD1 es diferente a F2CD1 y F3CD1. En suelos D1 sin cultivo F3 es estadísticamente diferente a F1 y F2 (Fig. 10).

Los suelos de las F2 y F3 son fuertemente ácidos, con pH menor a 5, significativamente menores a F1 ($p < 0.05$), que son ligeramente ácidos a neutros. En lo que respecta al tipo de lote (SCC y SWC), el comportamiento fue distinto en cada finca: en F1 el pH fue

significativamente mayor en suelos con cultivo, contrario a F3, donde el pH fue mayor en suelos sin cultivo; en F2 no se evidenciaron diferencias significativas. Con base a la profundidad, se observó que independientemente de la finca, los suelos rizosféricos no mostraron diferencias significativas en los suelos con y sin cultivo, sin embargo, se observó que a mayor profundidad había mayor pH tanto en los lotes con cultivo como los lotes sin cultivo en F1 y F2. En F3 esta tendencia sólo se observó en los lotes sin cultivo (Fig. 10).

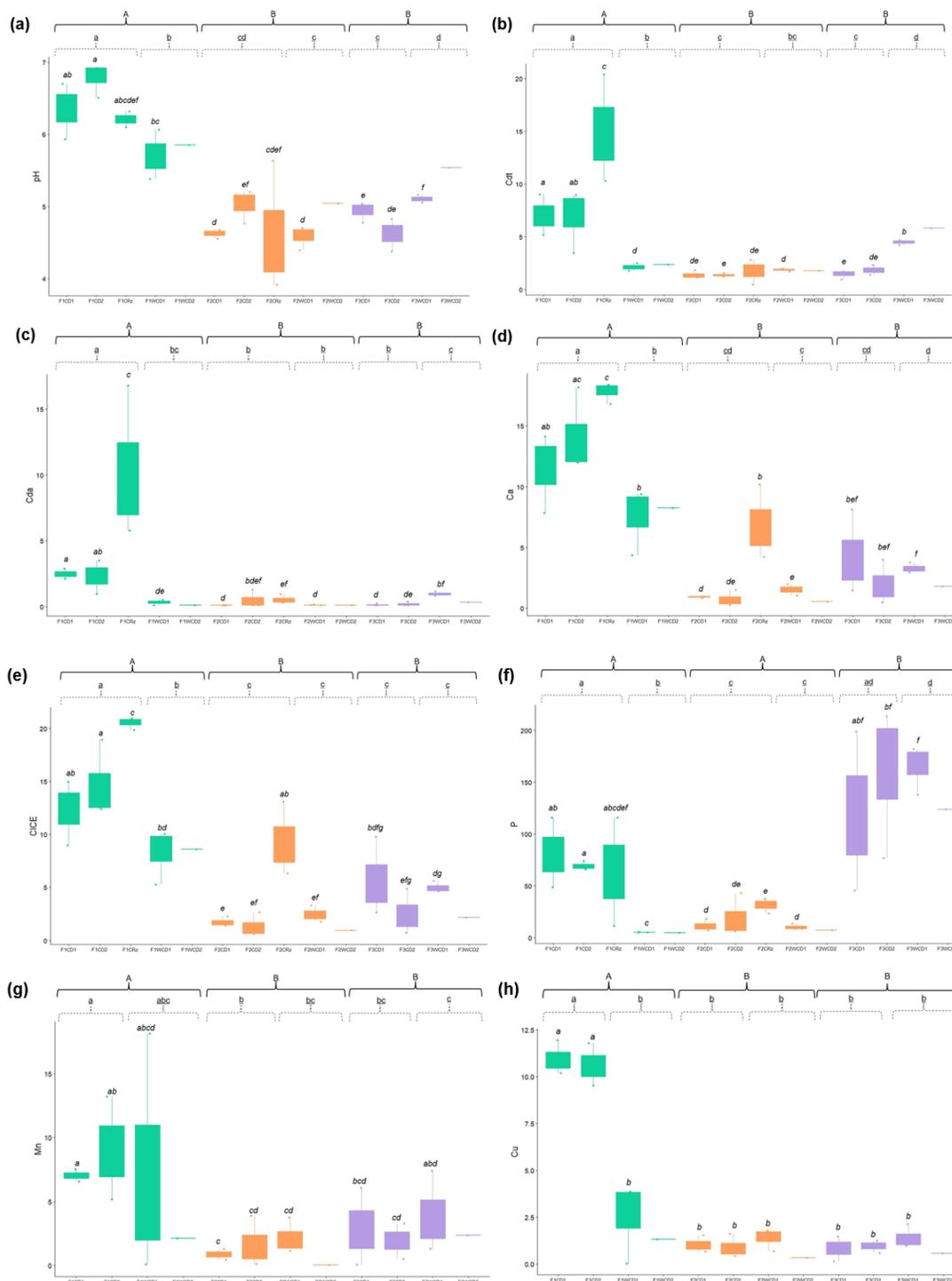


Figura 10. Concentración de pH, Cdt, Cda, Ca, CICE, P, Mn y Cu con relación a tipo de Finca (F1, F2 y F3), SCC (con cultivo); SWC (sin cultivo) y al tipo de muestra colectada [Rz (suelo rizosférico); D1 (0-30 cm); D2 (31-100 cm)]. Las letras mayúsculas representan las diferencias entre fincas; las letras minúsculas subrayadas representan las diferencias entre las muestras con y sin cultivo de cacao; las letras minúsculas representan las diferencias entre tipo de muestra colectada. Cada color representa una finca: F1 (verde), F2 (naranja), F3 (violeta). Las cajas etiquetadas con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según lo evaluado por el análisis con Kruskal- Wallis y Wilcoxon.

7.2 Correlación entre las propiedades fisicoquímicas del suelo, el Cdt y el Cda.

Utilizando el análisis de correlación de Spearman, se encontraron relaciones positivas significativas entre el pH y el Cdt (corr: 0.614, $p < 0,01$) y también, entre el pH y el Cda (corr: 0.464, $p < 0,01$) (Fig 2). Así mismo, se hallaron relaciones positivas significativas entre Cdt y Cda (corr: 0.943, $p < 0,01$), así como entre Cdt y Cu (corr: 0.774, $p < 0,01$) (Fig. 10), con concentraciones de Cd aumentando significativamente con Cu y viceversa. Otras propiedades del suelo, como Ca, CICE y Mn se correlacionaron significativamente con Cdt y Cda. Por otra parte, el P también se correlacionó con Cdt (corr: 0.119) y Cdd (corr: -0.018), sin embargo, esta no fue significativa (Fig. 11).

En lo que respecta a la correlación de las propiedades evaluadas en cada finca, se evidenció que en F1, el Cdt y el Cda se relacionan positivamente con el Ca (corr: 0.765; corr: 0.686), CICE (corr: 0.810; corr: 0.746), pH (corr: 0.301; corr: 0.112), Cu (corr: 0.681; corr: 0.534), P (corr: 0.335; corr: 0.120) y Mn (corr: 0.133; corr: 0.121). Sin embargo, estas correlaciones sólo fueron estadísticamente significativas entre el metal (Cdt y Cda) y el Ca ($p < 0,01$) la CICE ($p < 0,01$) y el Cu ($p < 0,05$). En F2, el Cdt se relacionó negativamente con el pH (corr: -0.716), el Cu (corr: -0.666), Mn (corr: -0.557), Ca (corr: -0.141) y CICE (corr: -0.113), pero sólo hubo significancia estadística entre el Cdt y el pH ($p < 0,01$). El Cda tuvo correlación positiva con todas las propiedades, excepto con el pH (corr: -0.005). En F3, el Cdt tuvo una correlación positiva con el pH (corr: 0.688), el Mn (corr: 0.269), el Cu (corr: 0.265) y el P (corr: 0.230) y negativa con Ca (corr: -0.113) y CICE (corr: -0.068), evidenciándose sólo una leve relación estadística significativa entre el pH y el Cdt ($p < 0,05$). El Cda tuvo una correlación positiva con todas las propiedades, pero sólo significativa con el Cdt (corr: 0.736, $p < 0,05$) (Fig. 11).

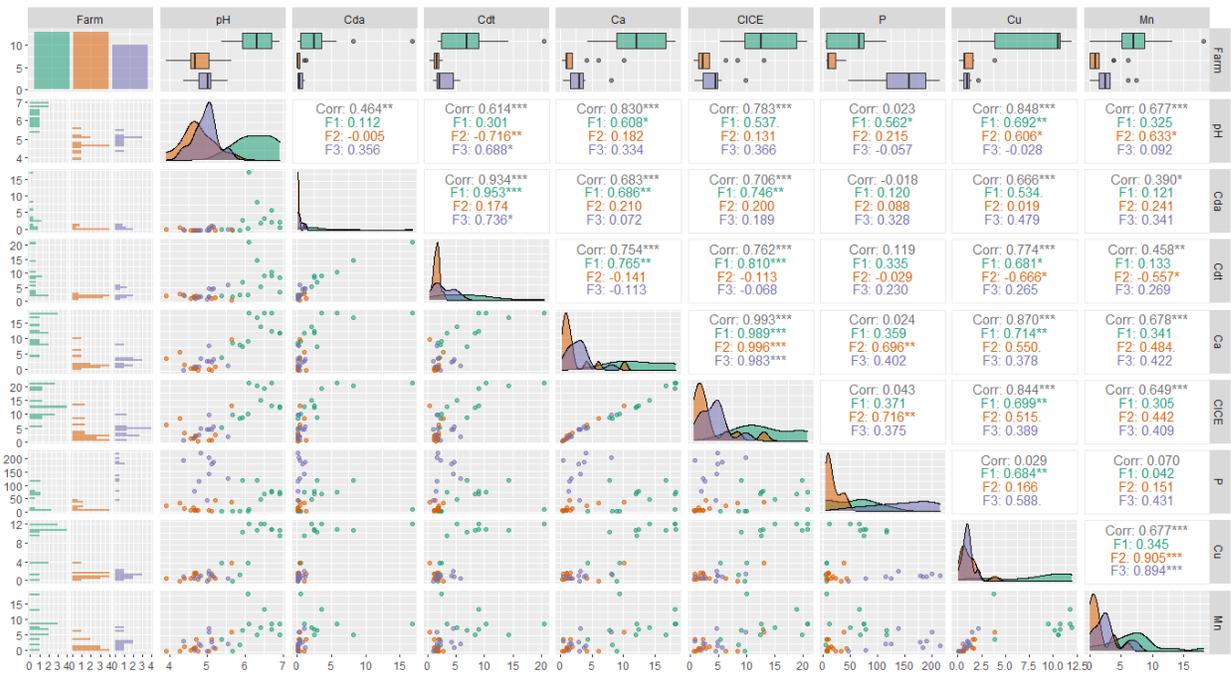


Figura 11. Correlaciones entre las propiedades fisicoquímicas de los suelos discriminado por finca. Cada color representa una finca (F1: verde; F2: naranja y F3: morado). Cdt (Cadmio total); Cda (Cadmio disponible); Ca (Calcio), CICE (Capacidad de intercambio catiónico efectiva); Cu (Cobre); Mn (Manganeso); P (Fósforo); Corr (resultado del valor P de Spearman). Diferencias significativas indicadas con asteriscos: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,001$.

7.3 Datos de secuenciación y diversidad bacteriana en los suelos.

7.3.1 Visión general de la secuenciación.

Para las 36 muestras de suelo se obtuvo un total de 7.995.444 lecturas crudas (forward y reverse) de la región V4 del gen ARNr 16S, con valores mínimos y máximos de 59.112 y 387.910 respectivamente y una media de 222.096. Una vez analizada la calidad de las lecturas mediante FastQC v 0.11.9 (Andrews, 2010) y MultiQC (Ewels *et al.*, 2016) se decidió continuar el flujo bioinformático con las lecturas “forward” y se procedió a ejecutar Trimmomatic v0.39 (Bolger, Lohse y Usadel, 2014) y Sickle v1.33 (Joshi y Fass, 2011) para la eliminación de adaptadores, lecturas de baja calidad (Phred Score: < 20) e indeterminaciones (N) respectivamente. Después del preprocesamiento quedaron un total de 3.922.020 lecturas de buena calidad, con valores mínimos de 28.893, máximos de 190.216 y una media de 108.889. Posteriormente se importaron los datos a Qiime2-2021.11 (Bolyen *et al.*, 2019), donde se ejecutó la herramienta Dada2 para la eliminación de lecturas quiméricas, la desreplificación y la construcción de tablas de características. En total quedaron 2.268.395 lecturas (longitud promedio: 230 bps) con valores mínimos de 13.420, máximos de 101.178 y una media de 62.707 que se agruparon en 18.616 ASVs (Anexo 6).

7.3.2 Análisis de diversidad alfa.

Las curvas de rarefacción obtenidas indican que la mayoría de las muestras se secuenciaron con la profundidad suficiente para estimar la diversidad de las comunidades bacterianas. Esto se puede decir porque las líneas en los gráficos de rarefacción resultantes logran llegar a la asíntota (Fig. 12). Así mismo en la figura se observa que la muestra F3CD1R1 es la más diversa, ya que el número de ASVs diferentes es mayor en comparación que las otras muestras. Por el contrario, la muestra F1CD2R2 es la menos diversa, ya que el número de ASVs no aumenta mucho independientemente del número de secuencias analizadas.

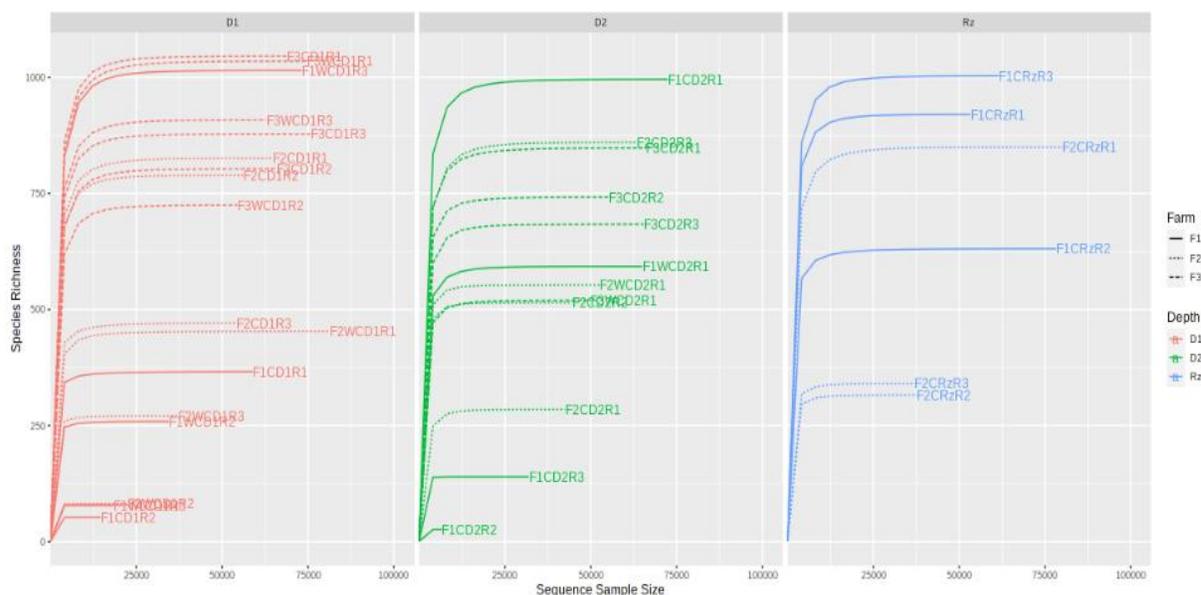


Figura 12. Curvas de acumulación de ASVs discriminadas por profundidad (D1: rojo, D2: verde y Rz: azul). Cada línea representa una muestra.

Los índices de alfa diversidad evaluados, Chao1, Shannon y Gini-Simpson indicaron comunidades altamente diversas con valores promedio de 975, 5.90 y 0.98 para F1, F2 y F3, respectivamente. A pesar de que no se evidenciaron diferencias significativas entre las distintas agrupaciones evaluadas (Tipo de finca; con y sin cultivo de cacao; tipo de muestra colectada; Rz y profundidad D1 y D2), se observaron las siguientes tendencias: a nivel de finca, se observó una ligera disminución en la riqueza (Chao1) y diversidad (Shannon) de F1 con respecto a F3; a nivel de cultivo, se observó que las muestras con cultivo (SCC) presentaron una mayor diversidad (Chao 1, Shannon) en comparación con las muestras sin cultivo (SWC) en F1 y F2; a nivel de profundidad, la diversidad (Chao1, Shannon) de la comunidad bacteriana de las muestras de suelo de F1 fue similar en D1 (SCC), D2 (SCC) y D2 (SWC). En F3 se observó el mismo comportamiento. Sin embargo, en F2, el D2 (SSC) presentó la mayor diversidad, seguido del D1 (SCC), Rz (SCC) y D2 (SWC). A nivel de muestra, F1CRz y F2WCD1 presentaron la mayor y la menor diversidad respectivamente, pero no se presentaron diferencias significativas entre las muestras (Fig. 13). En lo que respecta al índice de Gini-Simpson, todas las muestras obtuvieron valores cercanos a 1 (entre

0.95-0.99) (Fig. 13). El análisis de correlación de Spearman entre las variables y el índice de Shannon indicó que tiene una correlación positiva con Cdt, Cda, CICE., P y negativa con pH, Ca, Cu y Mn, no obstante estas correlaciones no fueron estadísticamente significativas (Anexo 7).

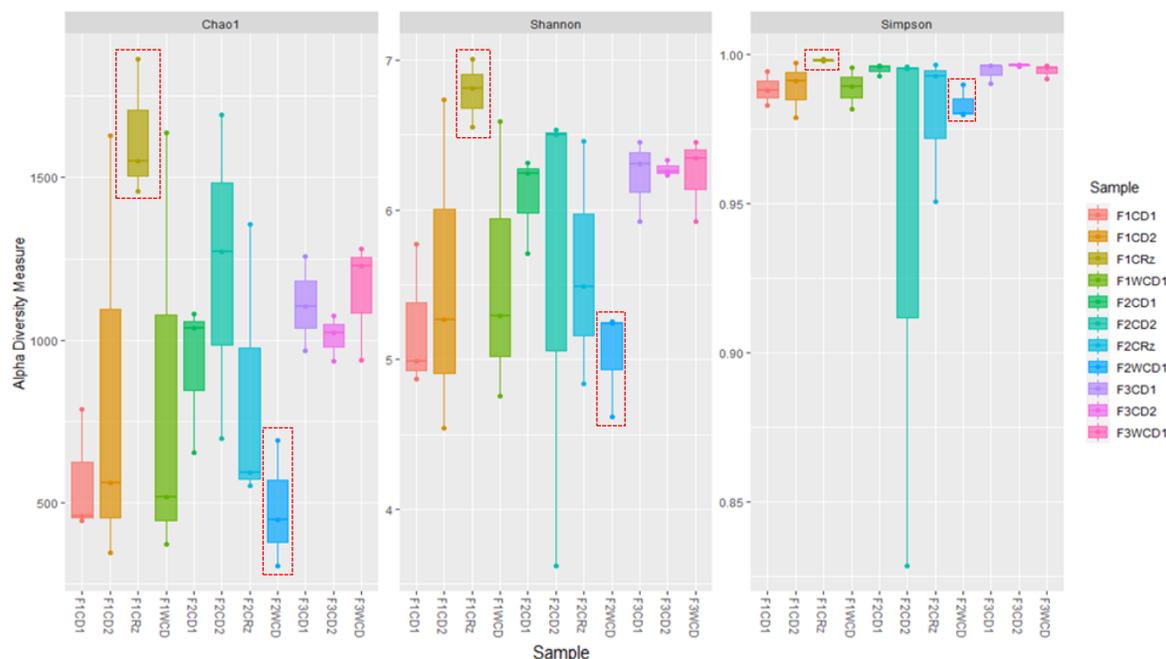


Figura 13. Índices de diversidad alfa evaluados a nivel de ASVs (Chao1, Shannon y Gini-Simpson (1-D)). Cada color representa una finca (F1: azul; F2: verde y F3: naranja). Las cajas resaltadas con el rectángulo rojo representan las muestras con mayor y menor diversidad. F1CD1: Farm 1-Cacao-Depth 1; F1CD2: Farm 1-Cacao-Depth 2; F1CRz: Farm 1-Cacao- Rhizospheric, F1WCD1: Farm 1-WithoutCacao-Depth 1; F2CD1: Farm 2-Cacao-Depth 1; F2CD2: Farm 2-Cacao-Depth 2; F2CRz: Farm 2-Cacao- Rhizospheric, F2WCD1: Farm 2-WithoutCacao-Depth 1; F2CD1: Farm 2-Cacao-Depth 1; F2CD2: Farm 2-Cacao-Depth 2; F2WCD1: Farm 2-WithoutCacao-Depth 1.

7.3.3 *Análisis de diversidad beta.*

Se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) para investigar los patrones de separación de comunidades bacterianas entre las muestras de suelo analizadas utilizando el índice de disimilitud UniFrac Ponderado y el análisis de permutación múltiple PERMANOVA (Fig. 14). Los ejes del PCoA (Axis 1: 40,2%; Axis 2: 19,6%) mostraron que las muestras se agruparon por finca (F1:13; F2:13 y F3:10) y que las comunidades bacterianas presentes en estas estaban significativamente separadas entre los tres sitios de muestreo ($p = 0,001$). Así mismo, los resultados indicaron que las muestras de F2 y F3 tienden a agruparse más en comparación con F1 (Anexo 8).

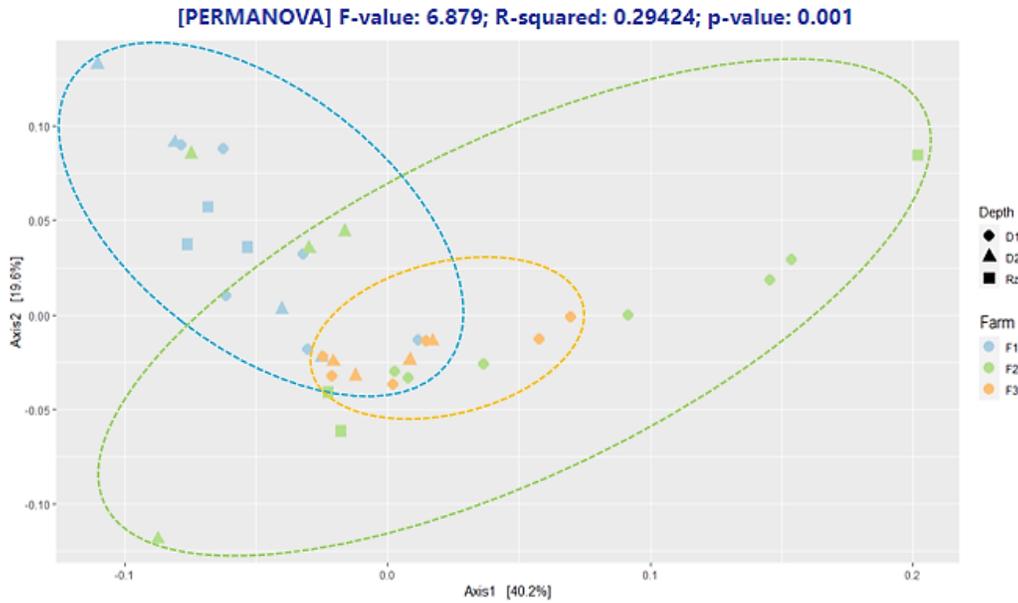
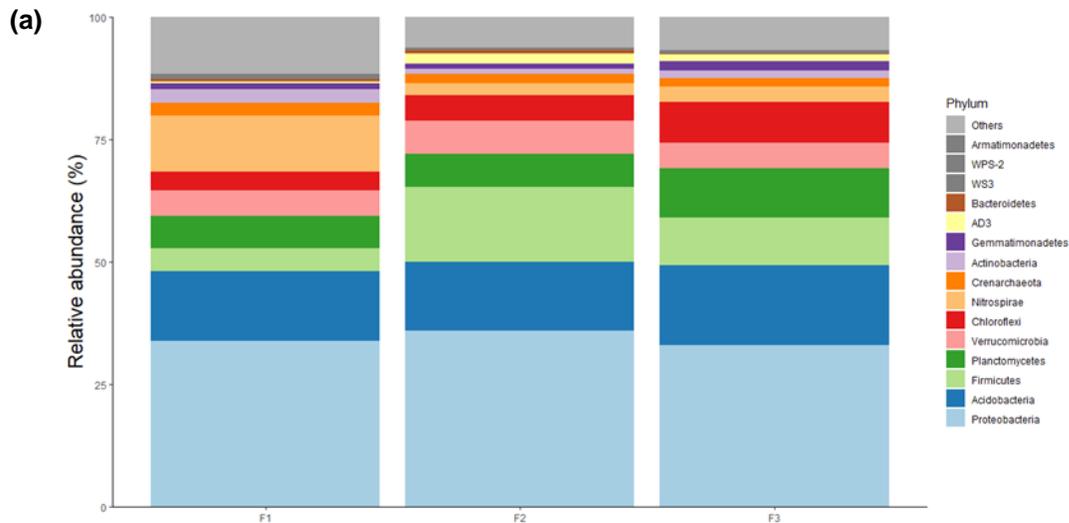


Figura 14. Distancia Unifrac Ponderada a nivel de ASVs. Cada color representa una finca (F1: azul; F2: verde y F3: naranja) y cada forma el tipo de muestra colectada (rombo: D1; triángulo: D2 y cuadrado: Rz).

7.2.3 Abundancia relativa de ASVs a nivel de filo y género.

Se identificaron 39 filos bacterianos en la totalidad de las muestras de suelo de las fincas cacaoteras, de los cuales los de mayor abundancia relativa fueron: Proteobacteria (38%), Acidobacteriota (15%), Firmicutes (12%), Verrucomicrobia (7%), Planctomycetes (6%), Nitrospirae (6%), Chloroflexi (5%) (Fig. 15a; 15b).



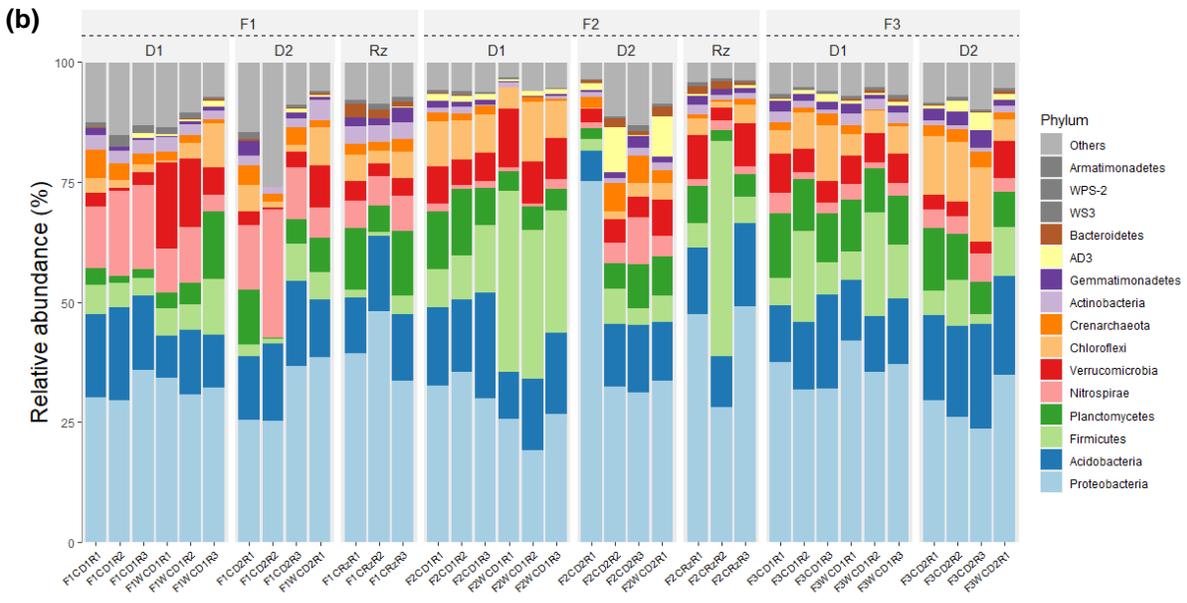
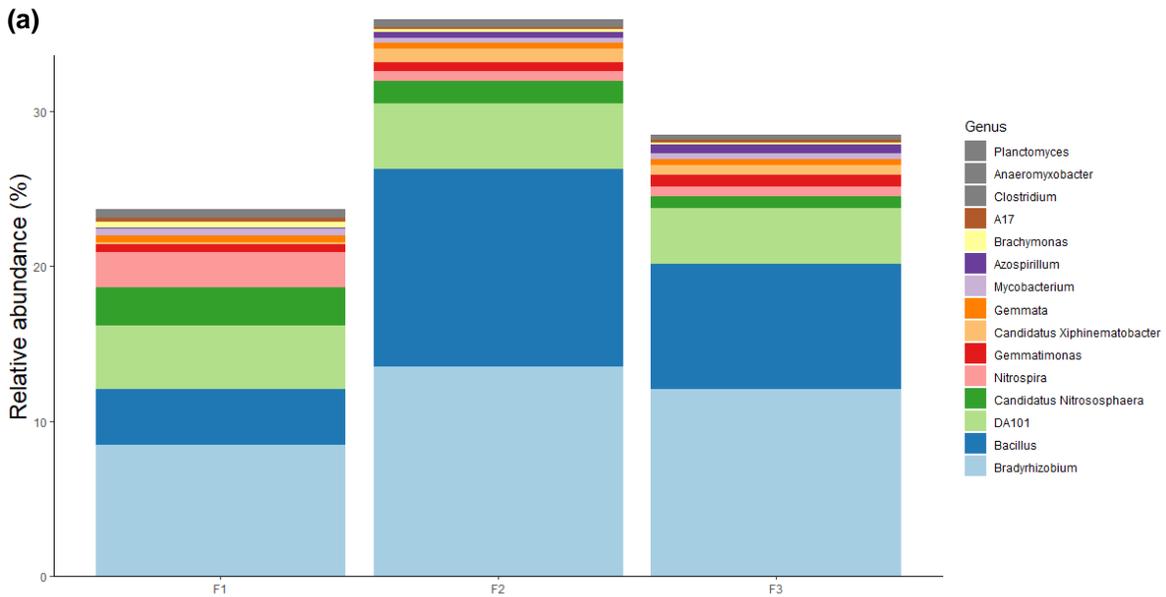


Figura 15. Histograma de la abundancia relativa de los filios bacterianos identificados en los diferentes sitios de muestreo discriminado por finca (F1: Finca 1, F2: Finca 2 y F3: Finca 3) y tipo de muestra colectada (Rz: suelo rizosférico, D1: 0-30 cm y D2: 31-100 cm). F1CD1: Farm 1-Cacao-Depth 1; F1CD2: Farm 1-Cacao-Depth 2; F1CRz: Farm 1-Cacao- Rhizospheric, F1WCD1: Farm 1-WithoutCacao-Depth 1; F2CD1: Farm 2-Cacao-Depth 1; F2CD2: Farm 2-Cacao-Depth 2; F2CRz: Farm 2-Cacao- Rhizospheric, F2WCD1: Farm 2-WithoutCacao-Depth 1; F2CD1: Farm 2-Cacao-Depth 1; F2CD2: Farm 2-Cacao-Depth 2; F2WCD1: Farm 2-WithoutCacao-Depth 1.

A nivel de género, fueron identificados 122 en el total de las muestras estudiadas. En la figura 16 se muestran los 15 géneros con mayor abundancia relativa.



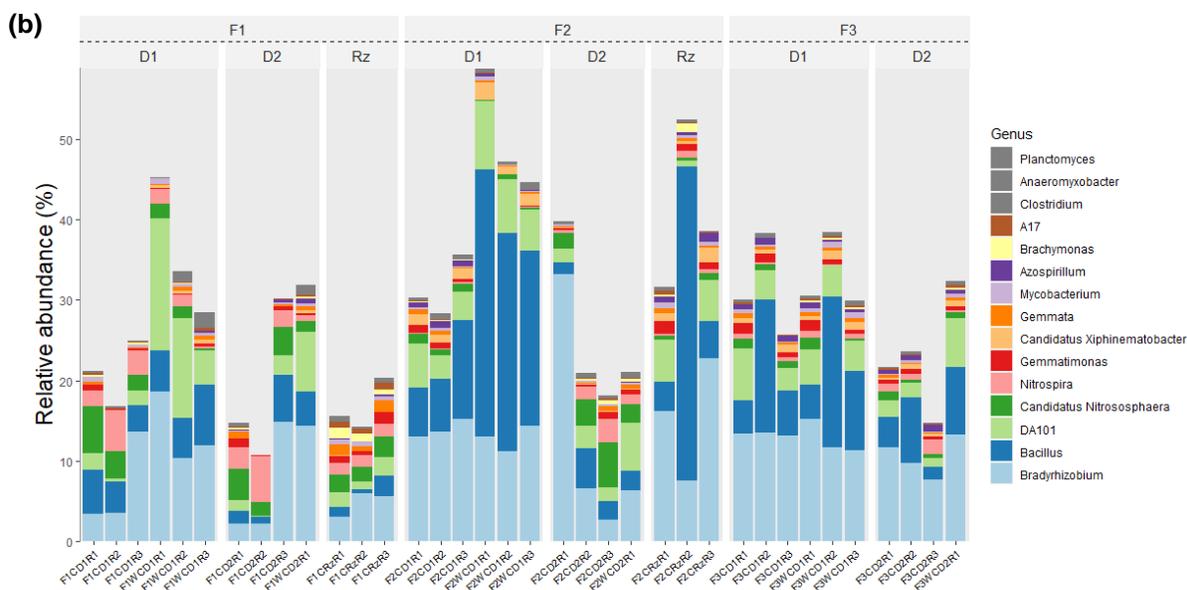


Figura 16. Histograma de la abundancia relativa de los géneros bacterianos identificados en los diferentes sitios de muestreo discriminado por finca (F1: Finca 1, F2: Finca 2 y F3: Finca 3) y tipo de muestra colectada (Rz: suelo rizosférico, D1: 0-30 cm y D2: 31-100 cm). F1CD1: Farm 1-Cacao-Depth 1; F1CD2: Farm 1-Cacao-Depth 2; F1CRz: Farm 1-Cacao- Rhizospheric, F1WCD1: Farm 1-WithoutCacao-Depth 1; F2CD1: Farm 2-Cacao-Depth 1; F2CD2: Farm 2-Cacao-Depth 2; F2CRz: Farm 2-Cacao- Rhizospheric, F2WCD1: Farm 2-WithoutCacao-Depth 1; F2CD1: Farm 2-Cacao-Depth 1; F2CD2: Farm 2-Cacao-Depth 2; F2WCD1: Farm 2-WithoutCacao-Depth 1.

7.2.4 Análisis de abundancia diferencial.

El análisis de abundancia diferencial realizada con LEfSe identificó varios taxones bacterianos que se enriquecieron en suelos que contenían una mayor concentración de Cd (F1) en comparación con suelos con una concentración menor (F2 y F3) (Fig. 17). Se evidenció que, a nivel de filo, los suelos sin cultivo de F1 tenían mayor abundancia de Verrucomicrobia y Chloroflexi en comparación con los suelos con cultivo de esta finca. En lo que respecta al tipo de muestra colectada, se observó que en F1CRz hay mayor abundancia de Cyanobacteria y Bacteroidetes que D1 y D2 (SCC, SWC). En F2 se observó una mayor abundancia de Firmicutes en F2CRz y F2WCD1 con respecto a las demás muestras, inclusive las correspondientes a F1 y F2. En F3, Chloroflexi fue el filo más abundante en D1 y D2 (SCC).

A nivel de género, en F1 se observó que *Nitrospira* presentó mayor abundancia en los suelos con cultivo que en los suelos sin cultivo y que *DA101* es más abundante en los suelos sin cultivo. *Gemmatimonas*, *Brachymonas* y *A17* son más abundantes en el suelo rizosférico en comparación con D1 (SCC) y D2 (SWC) en esta finca. En F2, *Bacillus* está más abundante en F2CRz y F2WCD1 que en las demás muestras y *DA101* es más abundante en los suelos sin cultivo. Por otra parte, *Azospirillum* es más abundante en D1SCC en comparación con las

demás muestras de F2. En F3, *Gemmatimonas* y *Azospirillum* fueron más abundantes en F3CD1 y A17 en F3WCD2.

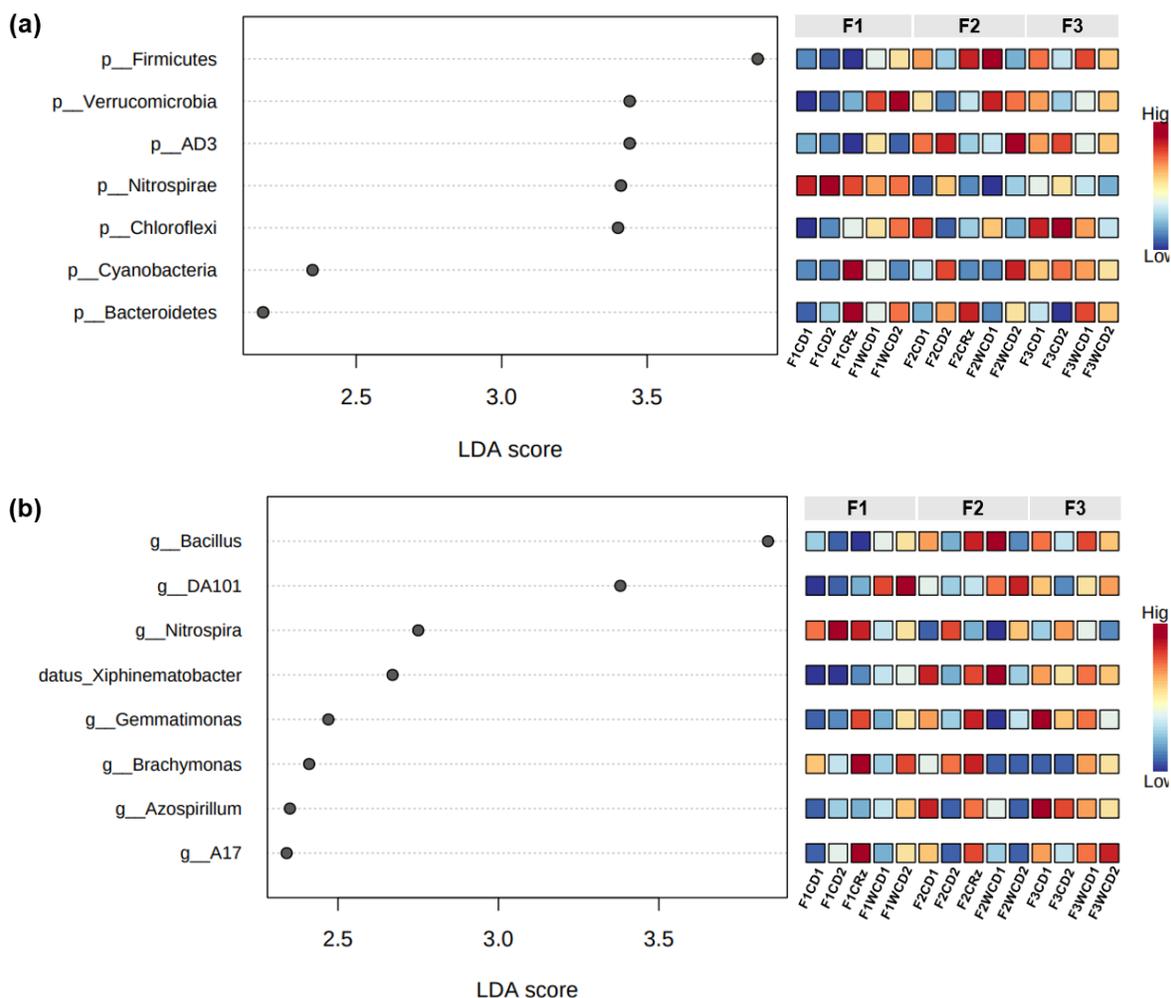


Figura 17. Gráfica del análisis discriminante lineal (LDA) muestra la diferenciación en el patrón taxonómico de las muestras a nivel de filo y género. La escala de color representa la abundancia de cada filo en las fincas, rojo indica alta abundancia y azul baja abundancia. F1CD1: Farm 1-Cacao-Depth 1; F1CD2: Farm 1-Cacao-Depth 2; F1CRz: Farm 1-Cacao- Rhizospheric, F1WCD1: Farm 1-WithoutCacao-Depth 1; F2CD1: Farm 2-Cacao-Depth 1; F2CD2: Farm 2-Cacao-Depth 2; F2CRz: Farm 2-Cacao- Rhizospheric, F2WCD1: Farm 2-WithoutCacao-Depth 1; F2CD1: Farm 2-Cacao-Depth 1; F2CD2: Farm 2-Cacao-Depth 2; F2WCD1: Farm 2-WithoutCacao-Depth 1.

7.3 Correlación entre las propiedades fisicoquímicas y las comunidades bacterianas.

Se utilizó el análisis de redundancia (RDA) para determinar la correlación entre las variables fisicoquímicas, incluido el Cdt y Cda en la abundancia de la comunidad microbiana basada en la métrica Bray-Curtis (Fig. 18). Los resultados muestran que para el primer (RDA1: 60.1%) y segundo eje (RDA2: 15.3%) los valores ponderados explican 78% de la variación. El análisis de ANOVA indicó que el modelo fue estadísticamente significativo ($p=0.001$), la

prueba de Mantel reveló correlaciones significativas entre las variables ambientales y la matriz de distancia ($p < 0.05$) y cada eje canónico resultante del RDA también es estadísticamente significativo ($p < 0.05$). Los resultados del RDA indicaron que Cu, pH, Ca, CICE y Cdt eran los factores ambientales más críticos en la abundancia de las comunidades bacterianas. La mayoría de las muestras de F1 están positivamente relacionados con altas concentraciones de Cd, pH, Ca, Cu, Mn y CICE y bajo fósforo. Por el contrario, las muestras de F2 y F3 se caracterizan por tener una menor concentración de Cd, pH, Ca, Cu, Mn y CICE y mayor fósforo (F3).

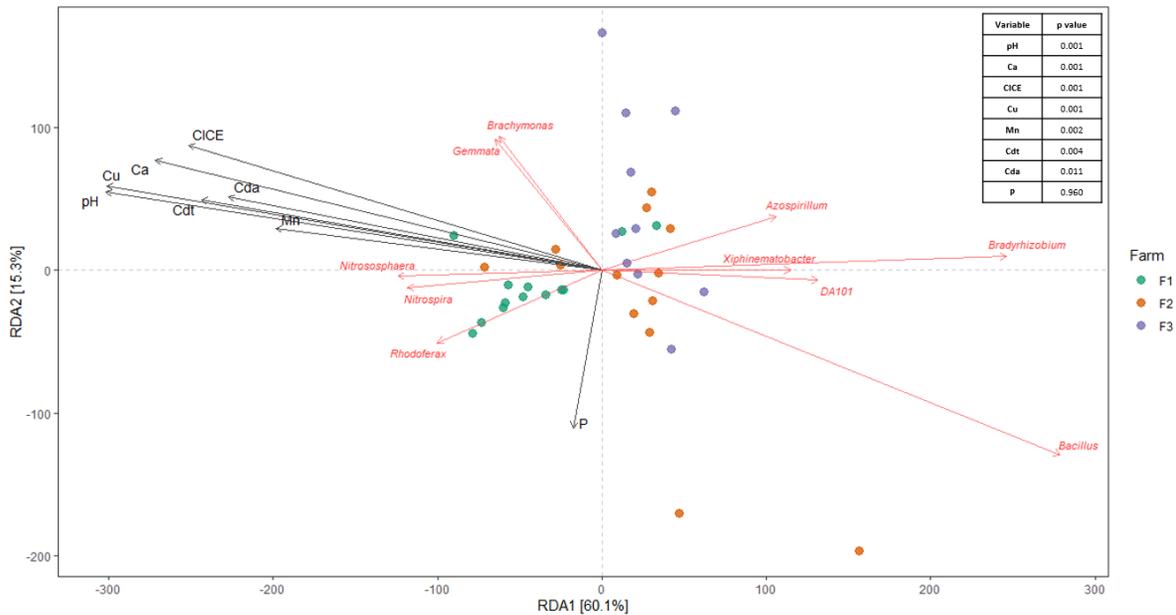


Figura 18. Análisis de redundancia (RDA) de las comunidades bacterianas y las propiedades fisicoquímicas del suelo incluido el Cdt y el Cda. Los círculos de color verde representan la F1, círculos color naranja F2 y círculos color morado F3. Las líneas rojas representan los géneros bacterianos y las líneas negras las variables fisicoquímicas abreviadas como Cdt (Cadmio total); Cda (Cadmio disponible), Cu (Cobre), CICE (Capacidad de intercambio catiónico efectiva); Ca (Calcio); Mn (Manganeso) y P (Fósforo).

7.4 Correlación entre las propiedades fisicoquímicas y la abundancia de taxones.

Para investigar la relación entre la abundancia relativa de las comunidades bacterianas, las propiedades de suelo y la concentración de Cd se utilizó la prueba de correlación de Spearman (Fig. 19). Los resultados señalan que los filos Actinobacteria y NKB19 presentaron correlación positiva con Ca, CICE, Cdt y Cda ($p < 0.01$). En cuanto a la abundancia del filo WPS-2 presentó correlación negativa con el pH, Ca y CICE ($p < 0.05$). Respecto al Cd (total y disponible), se encontró correlación positiva a nivel de filo con Actinobacteria, NKB19, FCPU426, OP3, GN02 y WS2 ($p < 0.05$) y a nivel de género con *Acidaminobacter*, *Coxiella*, *Tumeriella*, *Plesiocystis*, *Leptonema*, *Brachymonas*, A17 y *Candidatus Entotheonella*.

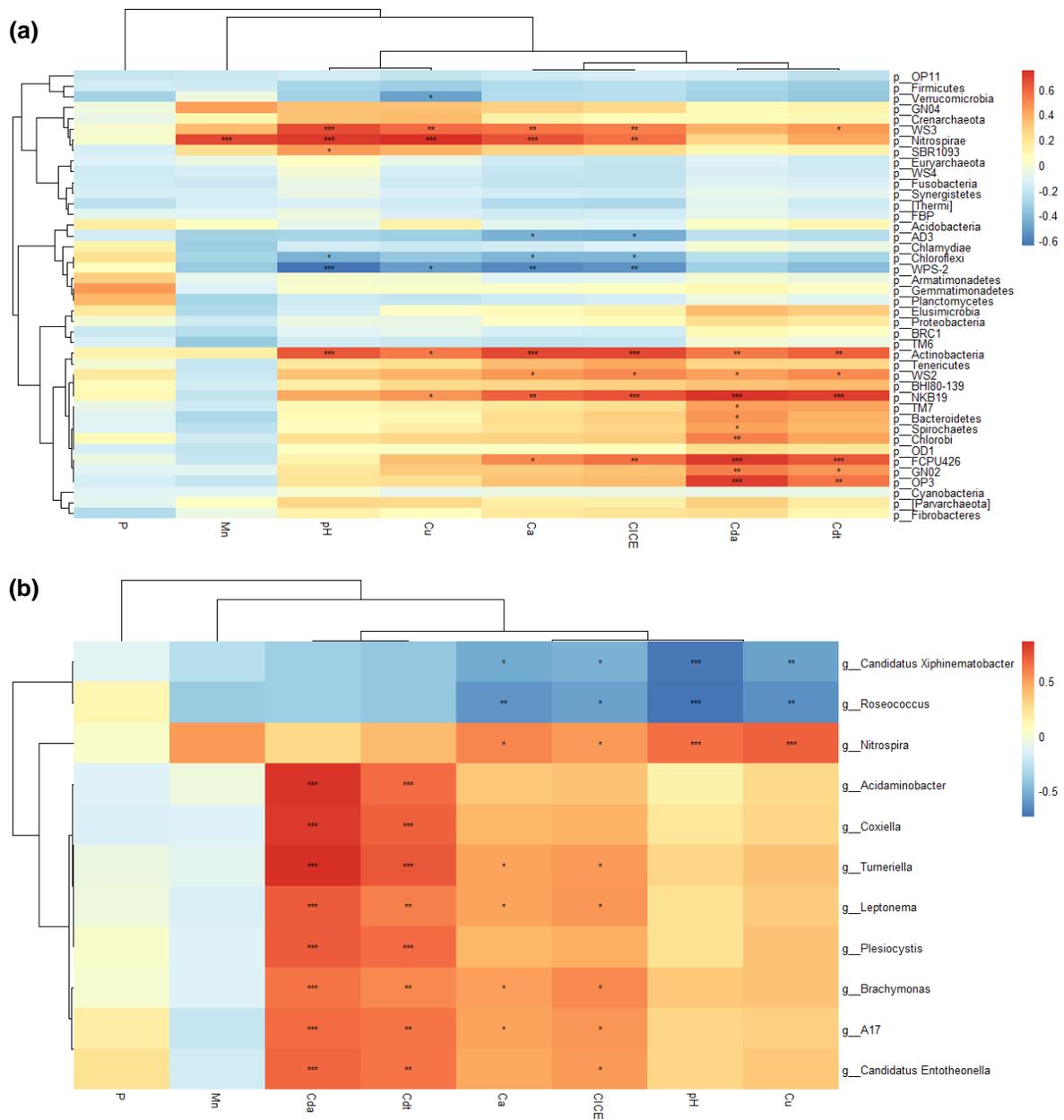


Figura 19. Mapa de calor de agrupamiento que muestra la correlación de Spearman entre la abundancia de los filios **(a)** y géneros **(b)** bacterianos identificados y las propiedades fisicoquímicas del suelo incluido el Cdt y el Cda. Las variables fisicoquímicas se encuentran abreviadas como Cdt (Cadmio total); Cda (Cadmio disponible), Cu (Cobre), CICE (Capacidad de intercambio catiónico efectiva); Ca (Calcio), P (Fósforo) y Mn (Manganeso). Diferencias significativas indicadas con asteriscos: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,001$.

A nivel de filo, en F1 el Cda se correlacionó significativamente ($p < 0.05$) con OP3, FCPU426 y Bacteroidetes, y a nivel de género con *Turneriella*, *Salsuginibacillus*, *Opiritatus*, *Agrobacterium* y *Acidaminobacter* ($p < 0.01$). En F2, a nivel de filo: WS3, SBR1093, GN04 y Gemmatimonadetes, y a nivel de género con *Suterella*, *Rodhoferax*, *Rodhobium*, *Plesiocystis*, *Pelotomaculum*, *Leptospora*, *Desulfovibrio* y *Desulfitobacter* ($p < 0.05$). En F3, sólo se observó correlación estadísticamente significativa entre el Cdt, Bacteroidetes (filio) y *Brachymonas* (género) (Fig. 20).

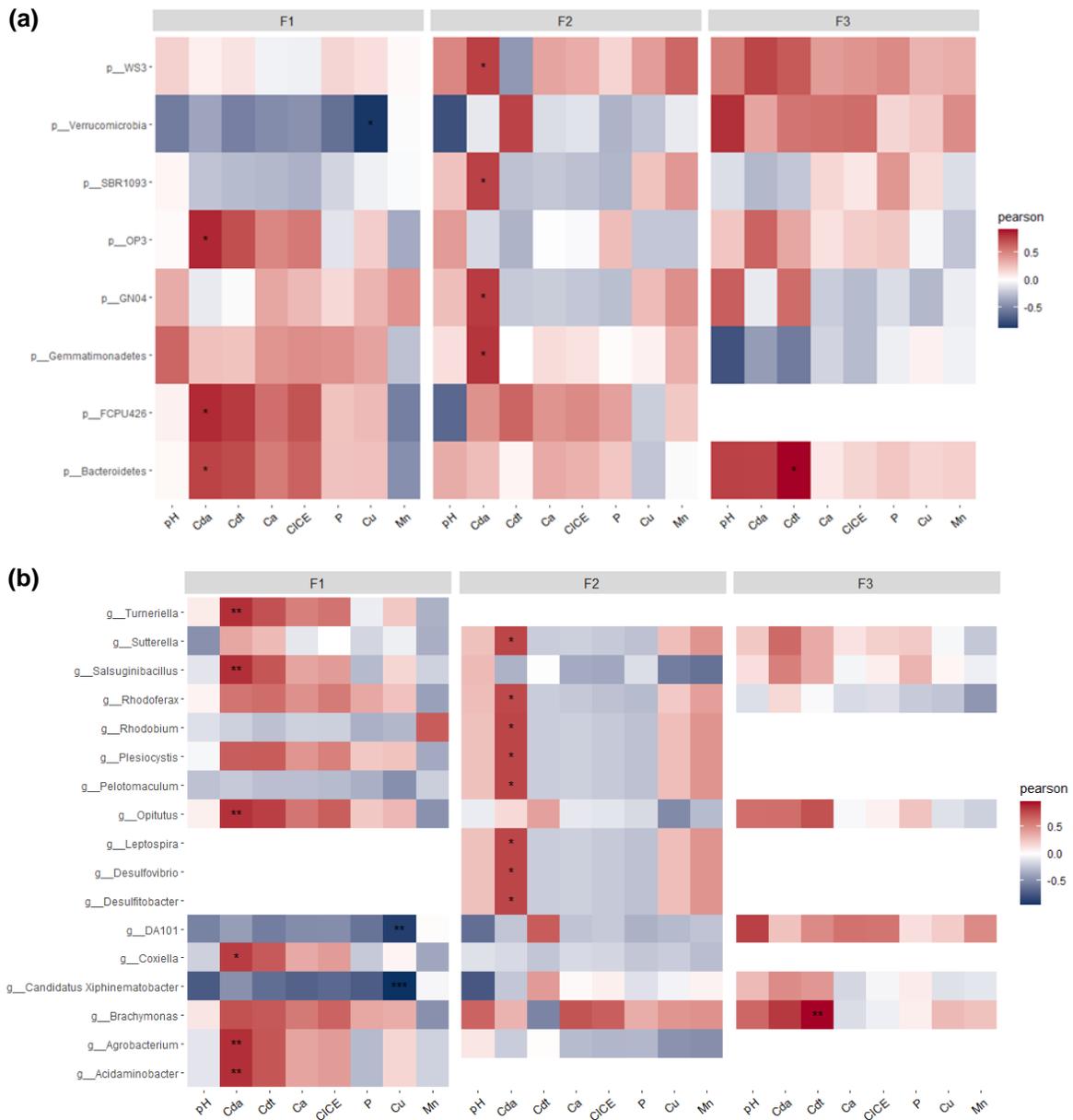


Figura 20. Correlaciones entre los filos (a) y géneros (b) bacterianos y las propiedades fisicoquímicas del suelo. Los colores rojo y azul indican relaciones positivas y negativas, respectivamente. El * y ** indican una correlación significativa para los niveles de $P < 0,05$ y $P < 0,01$, respectivamente. Cdt = Cadmio total; Cda = Cadmio disponible; Cu= Cobre, CICE= Capacidad de intercambio catiónico efectiva; Ca= Calcio, P= Fósforo; Mn= Manganeso.

7.5 Predicción funcional de las comunidades bacterianas presentes en los suelos.

En general, los grupos metabólicos más abundantes (>75%) en orden fueron: metabolismo, procesamiento de información ambiental, procesamiento de información genética y procesos

celulares. En el nivel 3, se destacaron los transportadores ABC, sistemas de dos componentes y metabolismo de purinas (Fig. 21).

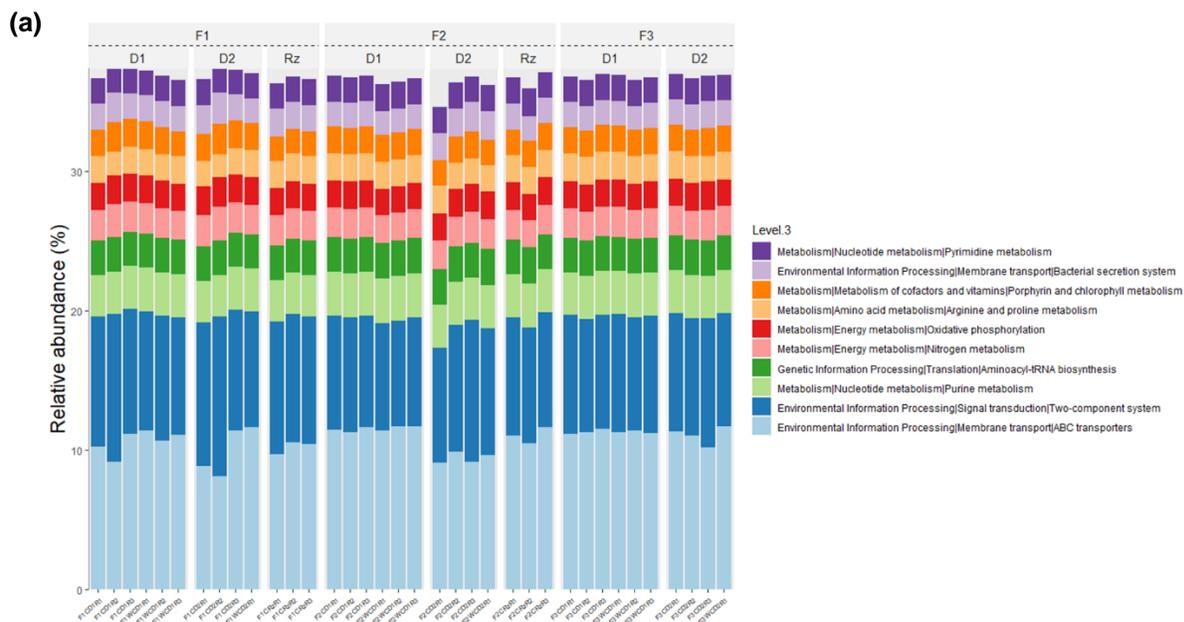


Figura 21. Abundancia relativa de las principales vías metabólicas predichas por Tax4Fun y anotadas en KEGG para los sitios de muestreo. Cada color representa un grupo diferente.

La caracterización funcional reveló diferencias significativas en algunos grupos entre las fincas, tal como se puede observar en la Fig. 22.

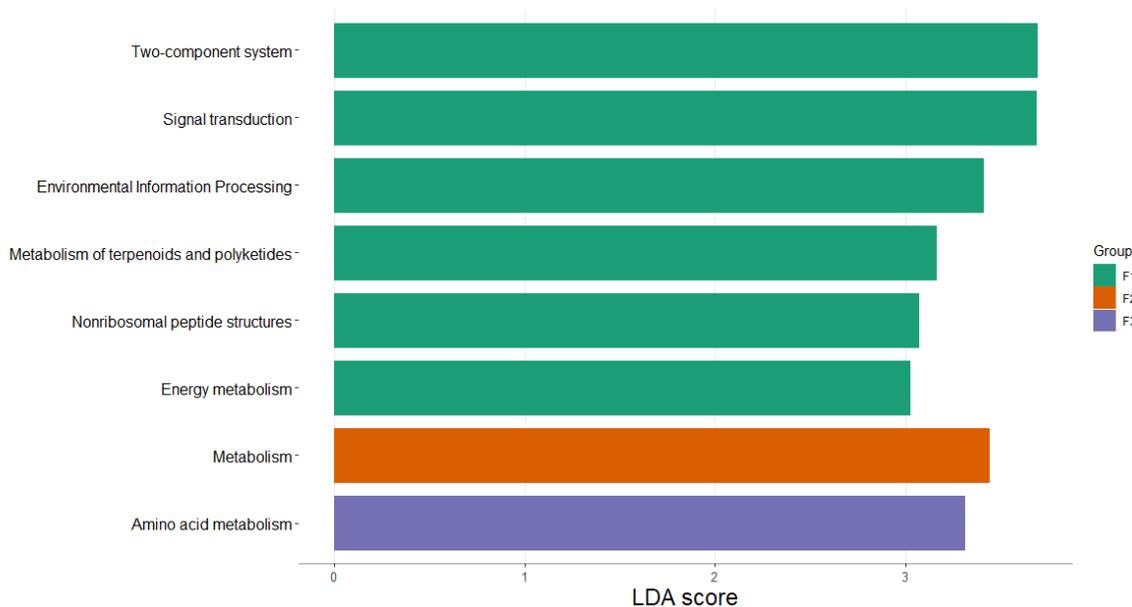


Figura 22. Abundancia diferencial de las principales vías metabólicas predichas por Tax4Fun discriminado por finca: F1 (verde); F2 (naranja); F3(morado).

8. DISCUSIÓN

8.1 Análisis fisicoquímico de los suelos y concentración de Cd²⁺ y Cda.

En esta investigación se evaluaron las propiedades físicas y químicas de diferentes muestras de suelo de tres fincas cacaoteras ubicadas en el municipio de Yacopí, Cundinamarca. En general, el 42,8% de los suelos fueron clasificados como franco-arcillosos, el 14,3% como franco-arcillo-arenosos y así mismo, el 14,3% como franco-arenosos (Anexo 4). Se ha descrito que los sistemas agroforestales de cacao se establecen típicamente en suelos limosos y franco arcillosos (Pratama *et al.*, 2022; Soler *et al.*, 2017), lo que indica que las clases de textura determinadas en los suelos estudiados son adecuadas para una óptima producción de cacao, ya que estas texturas permiten el adecuado movimiento de agua y nutrientes en el suelo. Así mismo, lo determinaron varios autores en investigaciones previas realizadas en suelos cultivados con cacao en Nigeria (Azeez *et al.*, 2021; Kekong y Ndifon, 2020), Indonesia (Pratama *et al.*, 2022) y Colombia (León- Moreno *et al.*, 2019). La textura del suelo no solo influye en la capacidad de este para almacenar agua y nutrientes (Pratama *et al.*, 2022) sino que también afecta la disponibilidad del Cd²⁺ en este agroecosistema (Adamu, 2019). Generalmente, los suelos con altos contenidos de arcillas tienen alta capacidad de adsorción y retención de cationes metálicos, lo que se refleja en una baja disponibilidad del metal (Adamu, 2019; Prakash *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2020). Varios estudios han descrito la relación positiva entre el Cd y las arcillas (Chavez *et al.*, 2015; Srinivasarao *et al.*, 2014; Sukarjo *et al.*, 2019), sin embargo, en la presente investigación dicha correlación no fue significativa.

Las concentraciones de microelementos y bases intercambiables obtenidas siguen el rango normal reportado para suelos cultivados con cacao (Van-Vliet y Giller, 2017), siendo los niveles medios de hierro los más altos (160, 96 mg·Kg⁻¹). El contenido de Cu para F2 y F3 se encuentra dentro del rango establecido para suelos colombianos (1-3 mg·Kg⁻¹) (Osorio, 2012) y coincide con lo reportado en estudios realizados previamente en suelos cacaoteros (Arévalo- Gardini *et al.*, 2016; Azeez *et al.*, 2021; Charrupi-Riascos y Martínez-Novoa, 2017). Sin embargo, es posible denotar en F1 una anomalía en el contenido de Cu mostrando valores por encima (entre 1,33 y 10,95 mg·Kg⁻¹) de las medias de F2 (0,91 mg·Kg⁻¹) y F3 (0,94 mg·Kg⁻¹), dicho patrón se puede observar también para Mn. Según el Servicio Geológico Colombiano (2018) en la zona existen anomalías geoquímicas para dichos elementos, encontrando valores en sedimentos que superan los 332 mg·Kg⁻¹ de Mn.

Por otra parte, el fósforo, en general presentó un comportamiento contrastante debido a que el 51,4% de los suelos cacaoteros presentó concentraciones altas (>40 mg/Kg) comparado con un 40% que presentaron concentraciones bajas (<20 mg/Kg) de acuerdo con la clasificación definida en el estudio de suelos del IGAC (2000), donde F3 presentó el mayor valor medio (142,42 mg·Kg⁻¹), seguido de F1 (44,93 mg·Kg⁻¹) y F2 (15,96 mg·Kg⁻¹) (Anexo 4). Dicha variabilidad es atribuida al material parental (presencia o ausencia de fosforitas) y a la fertilización fosforada (DAP).

En lo que respecta al pH, el 62,9% de los suelos muestreados tienen pH inferior a 5,5. Este hallazgo concuerda con lo descrito en las unidades cartográficas de suelos del municipio de Yacopí, los cuales indican que pertenecen a la categoría que va de moderada a extremadamente ácidos. Sin embargo, es importante mencionar que los suelos de F1 presentaron un pH moderadamente neutro (valor medio: 6,18). El pH es una variable fundamental debido a que define la solubilidad de los nutrientes y otros elementos presentes en la matriz del suelo (Husson, 2013). El pH ácido característico de los suelos del municipio de Yacopí favorece la disponibilidad de nutrientes como el Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} y B^{2+} e inclusive de elementos tóxicos para la planta como el Cd^{2+} (Jaramillo, 2011), razón por la cual el 66,6% de los productores evaluados usan enmiendas calcáreas. Esta aporta Ca^{2+} y Mg^{2+} a los suelos y actúa como corrector de pH con el fin de mejorar la disponibilidad de nutrientes, para obtener altos rendimientos y una mejor productividad (Ibarra *et al.*, 2009; Osorno, 2012; Soler, 2017). El pH regula también la actividad microbiana del suelo, por lo general la descomposición de materia orgánica es más eficiente en pH neutro y a su vez los procesos de descomposición de la materia orgánica favorecen la acidificación del pH en el suelo (Jaramillo, 2011).

En este estudio, la concentración de Cdt en los suelos de las tres fincas cacaoteras evaluadas fueron variables y mayores a los reportados a los niveles normales para suelos agrícolas ($0,43 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$) (Chavez *et al.*, 2015) y para zonas productoras de cacao de América Latina: Ecuador $0,40 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (Chavez *et al.*, 2015), Perú $0,53 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (Huamaní-Yupanqui *et al.*, 2012), Honduras $0,25 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (Gramlich *et al.*, 2018). Así mismo, los resultados obtenidos en esta investigación están de acuerdo con lo reportado por Soler (2017) y Rodríguez-Albarracín (2017), en estudios realizados en el municipio de Yacopí Cundinamarca.

Varios estudios han descrito que las concentraciones de Cdt en suelos no contaminados oscilan entre $0,07$ y $1,1 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ con un nivel de base natural de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (Chávez *et al.*, 2015; Charrupí y Martínez, 2017; Rofner, 2021), sin embargo, en esta investigación las concentraciones obtenidas se encontraron por encima de este rango (Fig. 10), lo que sugiere que los suelos cacaoteros muestreados se catalogan como leve a severamente contaminados con el metal pesado (Rodríguez y Rodríguez, 1982; Rodríguez *et al.*, 2019). En Colombia, Gil *et al.* (2020), Aguirre-Forero *et al.* (2020) y Bravo *et al.* (2021b) reportaron concentraciones de Cdt de $2,03 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, $0,19 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ y $3,50 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ en suelos de fincas cacaoteras ubicadas en Antioquia, Magdalena y Santander respectivamente.

La presencia de diferentes concentraciones de Cd en el suelo está principalmente relacionada con su origen: geogénico o antropogénico (Liu *et al.*, 2013). Se ha evidenciado que en los suelos ubicados sobre rocas sedimentarias y suelos tratados con fertilizantes fosfatados contienen las concentraciones más altas de Cd que oscilan entre $0,3$ a 15 mg/kg (Shahid *et al.*, 2016). Un enfoque comúnmente utilizado para identificar la fuente de contaminación es evaluar la distribución vertical de Cd a lo largo de un perfil de suelo hasta una determinada profundidad (Chavez *et al.*, 2015); en donde una concentración más alta de Cd en los materiales originales que en las capas de suelo suprayacentes puede sugerir una posible fuente geogénica de contaminación (Buccolieri *et al.*, 2010), en contraste, la contaminación antropogénica ocurre lo contrario, es decir mayores concentraciones de Cd en la superficie

del suelo (Caridad-Cancela *et al.*, 2005). En este estudio, la concentración de Cd varió con respecto a la profundidad y al tipo de lote donde fue recolectada la muestra. En los lotes con cultivo (SCC), en F1 y F2 la concentración de Cdt fue mayor en el suelo rizosférico (RZ) (F1CRz: 14,96 mg·Kg⁻¹; F2CRz: 1,75 mg·Kg⁻¹), seguido de la profundidad uno (D1: 0-30 cm) (F1CD1: 7,03 mg·Kg⁻¹; F2CD1: 1,39 mg·Kg⁻¹) y dos (D2: 31-100 cm) (F1CD2: 6,93 mg·Kg⁻¹; F2CD2: 1,38 mg·Kg⁻¹). Sin embargo, en los lotes sin cultivo (SWC), se presentó una distribución distinta, en F1 el contenido fue mayor en D2 que en D1 y en contraste, en F2 fue mayor en D1. En lo que respecta a F3, tuvo la misma distribución tanto en lotes con cultivo como en lotes sin cultivo (D2>D1). A pesar de la variabilidad en la distribución del Cd en el perfil del suelo, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre F1Rz con respecto a F1D1 y F1D2 (SCC, SWC) y ausencia de diferencias entre D1 y D2 en todas las fincas. Este hallazgo sugiere que en F1 (SCC) hay una posible contaminación de origen antropogénico, no obstante, en esta finca, el suministro de nutrientes en los cultivos de cacao depende principalmente de la descomposición de los desechos de las plantas y los residuos de la cosecha, por lo que es poco probable que la contaminación del suelo con Cd sea el resultado del uso de fertilizantes y/o abonos. Así mismo lo reportó Chavez *et al.* (2015), Gramlich *et al.* (2018) y Aguirre-Forero *et al.* (2020).

La distinción entre fuentes geogénicas y antropogénicas es importante para el manejo de suelos contaminados. Sin embargo, la relación entre el metal pesado y las propiedades fisicoquímicas del suelo permiten determinar su biodisponibilidad, lo cual es relevante desde una perspectiva biológica (Shahid *et al.*, 2016). En esta investigación no se pudo determinar el posible origen del Cd en los suelos cacaoteros estudiados. Sin embargo, investigaciones previas realizadas en la zona han reportado que la presencia de Cd a altas concentraciones está asociada al material parental (origen geogénico) (Rodríguez *et al.*, 2019). Se ha descrito que esta región está compuesta por varios tipos de rocas sedimentarias como lutitas, calizas, areniscas, pedernales y fosforitas (Servicio Geológico Colombiano, 2015). Las rocas sedimentarias (0,01 a 2,6 mg·Kg⁻¹) exhiben niveles más altos de Cd en comparación con las rocas ígneas (0,07 a 0,25 mg·Kg⁻¹) y metamórficas (0,11 a 1,0 mg·Kg⁻¹) (Kubier *et al.*, 2020).

En los suelos, la biodisponibilidad de los metales está controlada por varios factores, como el contenido total y disponible del metal, el pH, la materia orgánica del suelo, la capacidad de intercambio catiónico, el contenido de arcillas y la cantidad de Mg y Zn (Alloway, 2013; Bravo *et al.*, 2014; Gramlich *et al.*, 2018; He *et al.*, 2015; Zug *et al.*, 2019). En este estudio, la correlación entre las variables fisicoquímicas y el Cdt reveló que éste se correlaciona positivamente con el Cda, Cu, CICE, Ca y pH con valores cercanos a 1 (Fig. 11). Se ha demostrado que los suelos con concentraciones elevadas de Cd suelen ir acompañados de un pH bajo (Luo *et al.*, 2019). Sin embargo, en el presente estudio se evidenció lo contrario. Este hallazgo coincide con lo reportado por Chavez *et al.* (2015), Rodríguez *et al.* (2019) y Bravo *et al.* (2021). Así mismo, como se mencionó anteriormente, el uso de enmiendas calcáreas suministradas al suelo con el fin de alcanzar el pH óptimo para la producción de cacao explicaría en cierta medida el aumento del pH en las zonas estudiadas.

El Cd se encuentra en el suelo asociado a diferentes fases: intercambiable, óxidos, carbonatos, materia orgánica, sulfuros y la fracción residual que no es disponible por las

plantas y microorganismos (He *et al.*, 2005; Kubier, 2019). En esta investigación se evidenció una correlación significativa entre el Cdt y Ca en F1, lo que indica posiblemente una estrecha relación del metal a la fracción unida a carbonatos. Según Chavez *et al.* (2016) la fracción de carbonatos es sensible al cambio de pH, por tanto, es fácilmente disponible en condiciones ácidas, como lo es la rizosfera donde hay liberación de ácidos orgánicos. Estos resultados, concuerdan con lo encontrado por Rodriguez (2017) en suelos del municipio de Yacopí, donde la fracción unida a carbonatos alcanzó niveles de $13,25 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$, así mismo con lo reportado por el SGC (2015) y IGAC (2002) que mencionan predominancia de material parental sedimentario especialmente calizas. El Cd puede sustituir a cationes divalentes como el Ca, Fe, Zn, Pb y Co en diferentes minerales como consecuencia de su radio iónico similar enriqueciendo carbonatos y fosfatos, aumentando el contenido del metal en el suelo en el proceso pedogenético (Kubier *et al.*, 2019; Smolders y Mertens, 2013). En cuanto a la CICE también se encontró correlación positiva y significativa con el Cdt y Cda en F1 ($p < 0.01$) (Fig. 11). Resultados similares fueron reportados por Argüello *et al.* (2018).

8.2 Datos de secuenciación y diversidad bacteriana en los suelos.

Las comunidades bacterianas se ven afectadas por las propiedades fisicoquímicas del ecosistema en el que habitan y más aún, por la presencia de diversos contaminantes como los metales pesados (Nikolova *et al.*, 2022). Índices de diversidad alfa como Chao1, Shannon y Gini-Simpson se utilizan para evaluar la riqueza, uniformidad y dominancia de las comunidades microbianas (An *et al.*, 2022; Yuebing *et al.*, 2020). En este estudio, los altos valores del índice de Shannon (entre 3.58 y 7.03) indicaron alta riqueza y uniformidad de taxones en las muestras estudiadas, lo que coincide con los valores obtenidos con el índice de dominancia de Gini-Simpson (entre 0.95-0.99). Resultados semejantes han sido previamente reportados en otras investigaciones realizadas en suelos contaminados con metales pesados (Hong *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2022). A pesar de que no se presentaron diferencias significativas en los valores de los índices de diversidad alfa calculados entre las muestras analizadas, se observó una ligera disminución en la riqueza y diversidad de los suelos con cultivo con mayor concentración de Cd (F1) con respecto a F3, lo que indica que hubo una perturbación sobre la diversidad bacteriana.

Varios estudios han demostrado que la estructura y función de las comunidades bacterianas del suelo se ven significativamente afectadas por la presencia de altas concentraciones de Cd en el ecosistema en el que habitan (Guo *et al.*, 2017; Salam *et al.*, 2020; Shentu *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2022). Esto puede evidenciarse por la disminución en el número de microorganismos locales de la comunidad con sensibilidad al metal y el incremento de microorganismos tolerantes (Guo *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2017). En el presente estudio, la ausencia de valores diferencialmente significativos en los índices de diversidad alfa entre las muestras evaluadas sugiere que las comunidades bacterianas se adaptaron a la presencia natural del metal pesado en el suelo (Azarbad *et al.*, 2014; Epelde *et al.*, 2015; Cáceres *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2017). La contaminación a largo

plazo pudo haber permitido la adaptación local y una mayor diversidad de "especies" endémicas (Epelde *et al.*, 2015). Se ha descrito que las comunidades bacterianas pueden adaptarse y sobrevivir a los efectos adversos del Cd mediante diversos mecanismos dentro de los que se encuentran: (I) secuestro extracelular e intracelular, (II) exclusión por barreras de permeabilidad, (III) detoxificación enzimática, (IV) bombas de eflujo, entre otros (Abbas *et al.*, 2018; Bravo & Braissant, 2021; Huang *et al.*, 2021).

Por otra parte, se obtuvo una correlación negativa entre el índice de diversidad de Shannon y el pH, el Ca, el Cu, el Mn y una correlación positiva con el metal pesado (Cdt y Cda), la CICE y el P. Sin embargo, estas correlaciones no fueron estadísticamente significativas (Anexo 7). Varios autores indican que la correlación débilmente positiva entre las comunidades bacterianas del suelo y el metal pesado presente en el ecosistema permitió a muchas bacterias adaptarse y tolerar diferentes concentraciones de Cd (Cáceres *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2017). Hallazgo que se relaciona con la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en los análisis de alfa diversidad entre las muestras.

El análisis de diversidad beta de las comunidades bacterianas se basó en la distancia UniFrac ponderado. La distribución de las muestras en los ejes indicó que las comunidades bacterianas estaban significativamente separadas entre los tres sitios de muestreo (F1, F2 y F3). Sin embargo, las comunidades no estaban completamente agrupadas con respecto a la concentración de Cd, lo que sugiere que otros factores también ayudaron a dar forma a la estructura de la comunidad bacteriana local. A pesar de que el nivel de Cd es un factor que influye significativamente en la estructura de las comunidades bacterianas del suelo, se ha descrito que otras propiedades, tales como la materia orgánica, el pH y otros nutrientes, pueden influir más e incluso, pueden ayudar a contrarrestar los efectos adversos del Cd (Deng *et al.*, 2022).

En lo que respecta a taxonomía y porcentaje de abundancia relativa, se observó que la estructura de la comunidad bacteriana presente en suelos cacaoteros con concentraciones variables de Cd fue diferente y que algunos taxones fueron más abundantes que otros. En general, para todas las muestras analizadas, los filos más representativos en orden de abundancia fueron Proteobacteria, Acidobacteria, Firmicutes, Verrucomicrobia, Planctomycetes, Nitrospirae y Chloroflexi que representaron más del 75% de la población total y son consistentes con los de un estudio realizado en suelos cacaoteros por Cáceres *et al.*, (2021). Algunos de estos filos también han sido previamente reportados otros suelos bajo estrés del metal (Bravo *et al.*, 2021; Deng *et al.*, 2022; Icgen *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2018; Xiaoqi *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2021).

Proteobacteria es un filo ampliamente diverso (Cáceres *et al.*, 2021). Se ha informado que miembros de este filo tienen varias propiedades morfológicas, fisiológicas y metabólicas que facilitan su adaptación y predominio en suelos con diversas condiciones ambientales, incluido el estrés causado por metales pesados (Chen *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2017; Salam *et al.* 2020). Por otra parte, los miembros del filo Acidobacteria son microorganismos que se caracterizan por su preferencia por ambientes ácidos, baja abundancia y dificultad para aislarse en medios de cultivo tradicionales (Cui *et al.*, 2022). Se ha descrito que la tolerancia

del filo Acidobacteria a los metales pesados está relacionada con su naturaleza acidófila; incluso, se ha señalado que la abundancia relativa de Acidobacteria y el contenido de Cd tienen una correlación positiva (Cui *et al.*, 2022; Xu *et al.*, 2021).

A pesar de que Firmicutes fue uno de los filos más abundantes en la totalidad de las muestras, se evidenció que este disminuyó conforme aumentó la concentración de Cd, encontrándose para F1 un porcentaje de 6, F2: 17% y F3: 11%. Este hallazgo está acorde con lo reportado por Cáceres *et al.* (2021), quienes documentaron que había una correlación negativa entre Firmicutes y el metal pesado. En contraste, se observó que Nitrospirae aumentó con respecto a la concentración del metal (F1>F2 y F3). Nitrospirae es uno de los principales filos responsable de la oxidación del nitrito (nitrificación) que posee tolerancia al Cd (Mertoglu *et al.*, 2008). Al igual que en el presente estudio, Feng *et al.*, (2018) también reportaron el aumento en la abundancia de géneros pertenecientes al filo Nitrospirae en suelos contaminados con Cd (3.63%) en comparación con suelos no contaminados (0,49%).

A nivel de género se destacaron *Bradyrhizobium*, *Bacillus*, *DA101*, *Candidatus Nitrososphaera* y *Nitrospira*. Se ha descrito que *Bradyrhizobium* puede acumular Cd dentro de sus células al aumentar los niveles de glutatión intracelular en presencia de altas concentraciones del metal (Bianucci *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2014). El glutatión puede actuar como un agente desintoxicante al secuestrar iones Cd en centros de sulfuro, tioles y hierro-azufre (Jan *et al.*, 2019). También juega un papel importante en la defensa contra especies reactivas de oxígeno (Jan *et al.*, 2019; Nguyen *et al.*, 2019). *Bacillus* es un género perteneciente al filo Firmicutes que ha desarrollado tolerancia al Cd y puede desempeñar un papel importante en los suelos contaminados con el metal (Yu *et al.*, 2021). Dentro de los mecanismos de tolerancia al Cd ampliamente descrito para este género se encuentra la biosorción (Ali *et al.*, 2022; Muzammil *et al.*, 2020; Long *et al.*, 2021). Por ejemplo, un estudio realizado por Long *et al.*, (2021) demostró que la cepa de *Bacillus sp.* C9-3 exhibió una capacidad máxima de biosorción de 163.96 mg de Cd²⁺ por gramo de biomasa a pH 5. Los autores sugirieron que los grupos hidroxilo, carboxilo, carbonilo y amino en la biomasa de la cepa eran el principal sitio de unión al Cd (Long *et al.*, 2021). Por otra parte, se ha reportado que algunas especies de los géneros *Bradyrhizobium* y *Bacillus*, además de presentar tolerancia al Cd (Pandey *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2020), promueven el crecimiento de las plantas (PGP) (Pandey *et al.*, 2013). Las bacterias PGP tolerantes a los metales pesados estimulan el crecimiento de los brotes y las raíces de las plantas en presencia de niveles elevados de metales pesados y también ayudan a las plantas a superar el estrés causado por estos (Igiri *et al.*, 2018, Renn *et al.*, 2021). Debido a estas características, estas bacterias son consideradas como potenciales agentes biológicos para la remediación de suelos contaminados con Cd (Renn *et al.*, 2021). Un estudio realizado por Arce-Inga *et al.* (2022) en Perú reveló que algunos miembros de los géneros *Bacillus* (S1C2, R1C2) inicialmente aislados de la rizosfera de cultivos de cacao amazónico redujeron considerablemente el contenido de Cd en tallos de cacao contaminados con el metal. En Colombia, Quiroga-Mateus *et al.* (2022) reportaron que la aplicación de un inóculo preformulado de la cepa *Bacillus CdTB14* causó la disminución de 0,30 + 0,1 mg·Kg⁻¹ de Cd en el suelo.

Con el propósito de identificar biomarcadores a nivel de filo y género en las muestras de suelo de cada una de las fincas objeto de estudio de esta investigación, se realizó un análisis con LEfSe (tamaño del efecto del análisis discriminante lineal). De acuerdo con la figura 13a, Firmicutes fue el filo que se destacó por presentar un puntaje LDA mayor a 3,5. Así mismo se evidenció que la mayoría de las muestras correspondientes a F2 presentaron mayor abundancia de este filo con respecto a las muestras de F3 y F1. A nivel de género, en F1, *Nitrospira* (LDA>2,5), fue el taxón con mayor abundancia; en F2, *Bacillus* (LDA>3,5), *Candidatus xiphinematobacter* (LDA>2,5) y en F3, *Gemmatimonas* (LDA>2,0), *Azopirillum* (LDA>2,0). En lo que respecta al tipo de lote y muestra colectada, se observó que los suelos rizosféricos se caracterizaron por tener abundancia en géneros como *Gemmatimonas*, *Brachymonas* y *A17*; los suelos 2 con cultivo (SCC) por tener baja abundancia de *Bacillus* y *DA101*. Los resultados obtenidos indican la presencia de filos y géneros bacterianos tolerantes a varias concentraciones del metal pesado en los suelos cacaoteros estudiados. La presencia de Cd y las propiedades fisicoquímicas en dicho ecosistema posiblemente ocasionó el reensamblaje de las comunidades bacterianas, lo que se evidenció con el aumento de taxones tolerantes al metal, sumado a la pérdida de taxones sensibles; tal como se ha descrito anteriormente en otras investigaciones (Wang *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020).

8.3 Correlación entre las propiedades fisicoquímicas y las comunidades bacterianas.

Se ha descrito que las variaciones de la comunidad y la composición microbiana del suelo están relacionadas con varios factores bióticos y abióticos (Deng *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2014; Yi *et al.*, 2019). El análisis de redundancia con el que se evaluó el impacto de las variables fisicoquímicas sobre las comunidades bacterianas reveló que el Cdt junto al pH, CICE, Ca y Cu eran las variables que más influían en la abundancia de estas. Los resultados también indicaron que estas variables, en conjunto, separan las muestras con respecto al sitio de muestreo (F1 de F2 y F3). Adicionalmente se ha documentado que la contaminación del suelo con Cd puede causar un cambio en la composición de la comunidad microbiana (Luo *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020). Sin embargo, en el presente estudio, el Cdt y el Cda no fueron las variables que tuvieron un mayor impacto en la diversidad beta bacteriana por análisis RDA (Fig. 18), lo que coincide con lo reportado por Wang *et al.*, (2021).

Por otro lado, el mapa de calor de la correlación entre la abundancia de los taxones y las propiedades fisicoquímicas evaluadas indicó que el Cdt y el Cda eran variables que estaban significativamente correlacionadas con algunos filos y géneros identificados (Fig. 19). A nivel de filo Actinobacteria, NKB19, OP3 y WS2; a nivel de género, *Acidaminobacter*, *Coxiella*, *Tumeriella*, *Leptonema*, *Plesiocistys*, *Brachymonas*, *A17*, *Candidatus Entoteonella* tuvieron una correlación positiva significativa con el Cd. Actinobacteria es un filo que ha sido ampliamente descrito en varias investigaciones por su tolerancia a los metales pesados (El-Baz *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2021; Salam *et al.*, 2020). La exhibición de crecimiento filamentoso, la posesión de esporas que son recalcitrantes a varios tipos de estrés ambiental y la secreción de enzimas hidrolíticas extracelulares que degradan los compuestos orgánicos

del suelo y mejoran el ciclo del carbono, nitrógeno y otros elementos, proporcionan una ventaja distintiva para los miembros de este filo en el ecosistema del suelo (Salam y Obayori, 2019; Sun *et al.*, 2022). El mecanismo de tolerancia de Actinobacteria está relacionado con el equilibrio precipitación-disolución, que limita los cambios dinámicos de los iones metálicos libres en el suelo (Luo *et al.*, 2019). Por otra parte, el género *Acidaminobacter*, pertenece a Clostridiaceae, una familia bacteriana que ha sido relacionada con la tolerancia a metales pesados (Alexandrino *et al.*, 2014). La correlación de dichos filos y géneros bacterianos con el Cd sugieren que estos podrían estar cumpliendo un papel importante en la remediación del suelo.

El pH fue uno de los principales factores que determinó la diversidad de la comunidad bacteriana del suelo, tal como se ha descrito previamente en otros estudios (Deng *et al.*, 2022; Jiang *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020). El pH es una propiedad del suelo que puede influir directamente en el estado fisiológico de los microbiomas y alterar los nichos ecológicos (Cheng *et al.*, 2020). Sin embargo, en el presente estudio se encontró que las contribuciones del pH del suelo a los microorganismos en diferentes niveles de contaminación por Cd eran distintas (Fig. 19). Se evidenció que la mayoría de los géneros bacterianos presentes en F1 tenían más correlaciones significativas con el Cd que F2 y F3 y no significativas con el pH, lo que concuerda con investigaciones previas (Fig. 20b) (Luo *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2021).

Además del Cd y el pH del suelo, otros factores como el Cu, el Ca, la CICE, el Mn y el P también se relacionaron significativamente con las comunidades bacterianas (Deng *et al.* 2017; Zhang *et al.* 2019). No obstante, sólo se observó que en F1 el Cu tenía una correlación negativa significativa a nivel de filo con Verrucomicrobia y a nivel de género con *DA101* y *Candidatus Xiphinematobacter*. El Cu^{2+} es un elemento que en niveles moderados es considerado un micronutriente necesario para que los microorganismos lleven a cabo las actividades metabólicas normales (Li *et al.*, 2015). Sin embargo, las concentraciones excesivas de este elemento en el ecosistema del suelo pueden causar efectos negativos y tóxicos en los microorganismos habitantes y, por lo tanto, afectar el funcionamiento crítico de los procesos en los que intervienen (Li *et al.*, 2015; Nunes *et al.*, 2016). Al igual que el presente estudio, Nunes *et al.*, (2015) reportaron la disminución de miembros del filo Verrucomicrobia en suelos que contenían elevadas concentraciones de Cu.

8.4 Predicción funcional de las comunidades bacterianas presentes en los suelos.

La exposición a los metales pesados no solo cambia la estructura de la comunidad bacteriana del suelo, sino que también puede afectar sus propiedades funcionales (Liu *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2019; Tipayno *et al.*, 2018). Para caracterizar la distribución filogenética de las comunidades bacterianas, el análisis basado en el gen 16S rRNA es un marcador molecular eficaz que puede complementarse con la predicción de las capacidades funcionales de una comunidad microbiana (Tipayno *et al.*, 2018). Usando la predicción de las funciones de la comunidad bacteriana, en el presente estudio, se encontró que la mayoría de las anotaciones

en los tres sitios de muestreo (F1, F2 y F3) estaban involucradas con el metabolismo microbiano (abundancia relativa >50%) (Fig. 21), dentro de los que se encontraron genes involucrados en las vías del metabolismo de nucleótidos (purinas y pirimidinas), metabolismo del nitrógeno, fosforilación oxidativa, entre otros. De acuerdo con lo reportado por Feng *et al.* (2018), los microorganismos que habitan en suelos contaminados con Cd suelen presentar un aumento en la abundancia relativa de genes involucrados en el metabolismo conforme aumenta la concentración del metal, y que a su vez estos genes pueden estar relacionados con la potencial tolerancia al metal pesado. A diferencia de este estudio, los resultados obtenidos en esta investigación no mostraron cambios drásticos en la abundancia de dichos genes metabólicos con respecto a la concentración variable de Cd que contenían las muestras objeto de estudio, lo que posiblemente está relacionado con la adaptación filogenética y funcional de las comunidades bacterianas a dichos ecosistemas, tal como lo describe Azarbad *et al.* (2014). Sin embargo, se requiere realizar estudios de metagenómica de escopeta y metatranscriptómica.

Dentro del grupo de procesamiento de información ambiental, los transportadores ABC y el sistema regulador de dos componentes representaron la mayor abundancia en la predicción de la función metabólica (Fig. 21). Los transportadores ABC constituyen una de las familias de proteínas más grandes y están ampliamente distribuidas en casi todos organismos, desde bacterias, levaduras, hasta plantas y humanos (Ter-Beek *et al.*, 2014; Theodoulou & Kerr, 2015). En bacterias, los transportadores ABC participan en varias funciones biológicas, incluida la importación de metabolitos primarios como la maltosa, los polioles y la histidina; la exportación de antibióticos y metales pesados, entre otras (Ter-Beek *et al.*, 2014). Se informó que el transportador CzcABC jugó un papel importante en la tolerancia al Cd en *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas aeruginosa* (Ducret *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021). Por otra parte, el sistema regulador de dos componentes permite que las bacterias detecten, respondan y se adapten a una amplia gama de entornos, factores estresantes y franjas de crecimiento. Por lo tanto, cuando aumenta la concentración de iones de metales pesados en el ambiente exterior, aumenta la proporción del correspondiente sistema bicomponente de microorganismos, adaptándose así aún más al entorno complejo (Chen *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2019).

Para determinar si había diferencias en las abundancias y encontrar las vías de enriquecimiento importantes entre los suelos de las fincas estudiadas, se realizó un análisis discriminante lineal junto con el tamaño del efecto (LDA-LEfSe). Los resultados obtenidos indicaron que para F1 las vías más enriquecidas en orden de abundancia estaban relacionadas con: el sistema regulador de dos componentes y las estructuras peptídicas no ribosomales (nivel 3) (Fig. 22). En bacterias, los sistemas reguladores de dos componentes constituyen una forma dominante de control génico en respuesta a cambios en el entorno de un organismo (Groisman, 2016). Esta familia de proteínas ha sido implicada en la adaptación a una variedad de condiciones de estrés incluido el causado por metales pesados (Bouzat, y Hoostal, 2013; Liu *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2014). En estrés por Cd, Liu *et al.* (2021), demostraron que CzcR3, el regulador de respuesta del sistema de dos componentes CzcRS3 en el sistema Czc de *Pseudomonas putida*, activa la expresión de los genes de la bomba de

expulsión *czcABC1* y *czcABC2* al unirse directamente a sus promotores, lo que ayuda a la cepa a tolerar el estrés causado por el metal.

9 CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio se pudo concluir lo siguiente:

- ✚ Las concentraciones de Cd presente en los suelos estudiados fueron variables y superiores a los niveles establecidos para suelos agrícolas no contaminados ($0,43 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$) (USEPA, 2002) y para zonas productoras de cacao de América Latina, lo que indica que hay un enriquecimiento del metal en la zona.
- ✚ El suelo rizosférico de F1 se caracterizó por presentar la mayor concentración del metal y la mayor diversidad bacteriana.
- ✚ Los resultados de la secuenciación y los índices de diversidad alfa evaluados indicaron que las comunidades bacterianas que habitan los suelos cacaoteros estudiados son altamente diversas y homogéneas. Las ASVs totales fueron asignadas a 39 filos y 122 géneros diferentes. Entre ellos, siete filos (Proteobacteria, Acidobacteria, Firmicutes, Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chloroflexi y Nitrospirae) y seis géneros (*Bradyrhizobium*, *Bacillus*, *DA101*, *Nitrososphaera* y *Nitrospira*) fueron los más abundantes en todas las muestras.
- ✚ La disimilitud de las comunidades bacterianas basada en la métrica Unifrac ponderado reveló que las comunidades de F1 son significativamente diferentes a F2 y F3, quienes presentaron mayor similitud entre ellas.
- ✚ Se exploraron y analizaron los cambios en la estructura de la comunidad bacteriana bajo diferentes propiedades fisicoquímicas y concentraciones de Cd en varios tipos de suelo y se determinó que la variación en la abundancia de los principales géneros bacterianos identificados se relacionó con el pH, seguido del Cu y el Ca. Sin embargo, se evidenció que algunos géneros bacterianos (*Acidaminobacter*, *Agrobacterium*, *Opitutus*, *Salsuginibacillus*, *Tumeriella*) se correlacionaron positiva y significativamente con el Cd disponible ($p < 0.05$) en la finca que contenía elevadas concentraciones del metal (F1: $3,54 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$). Este hallazgo indica que estos géneros posiblemente están adaptados y poseen la maquinaria metabólica necesaria para tolerar el estrés causado por Cd.
- ✚ Los resultados de esta investigación indican que las comunidades bacterianas estaban adaptadas a las diferentes concentraciones de Cd presentes en los suelos cacaoteros. La identificación de los taxones bacterianos más abundantes seleccionados en este estudio permite orientar la selección de géneros potenciales para desarrollar productos biotecnológicos aplicados en la remediación de suelos contaminados por Cd y para entender los mecanismos de tolerancia que emplean las bacterias para sobrevivir a este elemento tóxico y de su relación con la planta.
- ✚ La predicción del potencial funcional de las comunidades bacterianas del suelo indicó que las vías metabólicas de mayor abundancia en las muestras objeto de estudio estaban relacionadas con los transportadores ABC y los sistemas de dos componentes, las cuales han sido asociadas con la tolerancia al metal pesado.

- ✚ La abundancia de los géneros *Bradyrhizobium* y *Bacillus* permite sugerir a estos dos géneros como potenciales microorganismos para la biorremediación de suelos contaminados con Cd.

10 RECOMENDACIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos se hacen las siguientes recomendaciones:

- ✚ El presente estudio brinda información importante sobre la concentración de Cd presente en diferentes muestras de suelo obtenidas de tres fincas cacaoteras del municipio de Yacopí- Cundinamarca. No obstante, en el suelo también pueden estar presentes otros metales como el mercurio (Hg), el plomo (Pb), el selenio (Se), el arsénico (As), el cromo (Cr), entre otros que en altas concentraciones pueden acumularse y ser tóxicos para los organismos vivos. Por tanto, es importante determinar la concentración de estos elementos y evaluar sus posibles interacciones en este ecosistema (suelo-planta).
- ✚ Monitorear el contenido del metal y estudiar la diversidad de la comunidad bacteriana en los suelos de las fincas cacaoteras evaluadas mediante la toma de muestras en diferentes tiempos, con el fin de evaluar la dinámica de las comunidades bacterianas en presencia de Cd respecto al tiempo.
- ✚ Esta investigación constituye un aporte parcial al conocimiento de la diversidad y funcionalidad de las comunidades bacterianas presentes en los suelos con cultivo y sin cultivo de cacao contaminados naturalmente con Cd. Por tanto, para obtener una visión más profunda de las alteraciones de la diversidad de las comunidades bacterianas del suelo, así como de sus funciones metabólicas en presencia de diferentes concentraciones de Cd, se recomienda combinar los enfoques metagenómicos de amplicón, de escopeta y metatranscriptómica en estudios futuros. Evaluar el efecto del metal sobre las comunidades bacterianas presentes en suelos cultivados con cacao en condiciones controladas (físicas y químicas), variando las concentraciones de Cd y tomando muestras en diferentes tiempos.
- ✚ Mediante métodos dependientes de cultivo, se sugiere el aislamiento, identificación bioquímica y secuenciación genómica de bacterias obtenidas a partir de las muestras de suelo estudiadas con capacidad para tolerar altas concentraciones de Cd con el objetivo de identificar los genes y las rutas metabólicas involucradas en la tolerancia al metal pesado. También, una vez identificadas las bacterias, se pueden realizar estudios a nivel de laboratorio y de vivero para determinar la concentración mínima en la que se inhibe su crecimiento (MIC) ante la exposición al metal y para evaluar su accionar en presencia de distintos tipos de productos agrícolas que contienen Cd (como fertilizantes fosfatados, entre otros).
- ✚ Realizar estudios a gran escala que involucren muestras de suelos de los demás departamentos cacaoteros del país para evaluar su calidad, verificar el contenido de Cd y estudiar la composición de las comunidades bacterianas que habitan en estos ecosistemas con el propósito de obtener más información sobre las comunidades bacterianas y fúngicas presentes en los suelos cultivados con cacao.

11 ANEXOS

ANEXO 1. Protocolo de extracción y cuantificación de ADN.

1. Agregar 0,25 gramos de muestra de suelo al tubo PowerBead proporcionado. Agitar suavemente para mezclar.
2. Agregar 60 µl de Solución C1 y agitar brevemente.
3. Fijar los tubos PowerBead horizontalmente en un adaptador vortex y mezclar a máxima velocidad durante 10 minutos.
4. Centrifugar los tubos a 10.000 x g durante 30 segundos.
5. Transferir el sobrenadante a un tubo de recogida limpio de 2 mL.
6. Añadir 250 µl de Solución C2 y agitar en vórtex durante 5 segundos. Incubar de 2 a 8 °C durante 5 minutos.
7. Centrifugar los tubos durante 1 minuto a 10.000 x g.
8. Evitando el sedimento, transferir 600 µL de sobrenadante a un tubo de recolección limpio de 2 mL.
9. Agregar 200 µL de Solución C3 y agitar brevemente. Incubar de 2–8 °C durante 5 minutos.
10. Centrifugar los tubos durante 1 minuto a 10.000 x g.
11. Evitando el sedimento, transferir 750 µL de sobrenadante a un tubo de recolección limpio de 2 mL.
12. Agitar para mezclar la Solución C4 y agregar 1.200 mL al sobrenadante. Vortex durante 5 segundos.
13. Agregar 675 µL en una Columna MB Spin y centrifugar a 10.000 x g durante 1 minuto. Desechar flujo continuo.
14. Repetir el paso anterior dos veces, hasta que se haya procesado toda la muestra.
15. Añadir 500 µl de Solución C5. Centrifugar durante 30 segundos a 10.000 x g.
16. Desechar el líquido sobrante. Centrifugar de nuevo durante 1 minuto a 10.000 x g.
17. Colocar con cuidado la Columna MB Spin en un tubo de recogida limpio de 2 mL.
18. Agregar 100 µL de Solución C6 al centro de la membrana de filtro blanca.
19. Centrifugar a temperatura ambiente durante 30 segundos a 10.000 x g. Desechar la columna giratoria MB y almacenar la muestra de ADN en congelación (–20 °C a –80 °C).
20. Para la cuantificación del ADN total extraído, se debe preparar la solución de trabajo Qubit™ diluyendo el reactivo Qubit™ HS dsDNA 1:200 en el tampón Qubit™ dsDNA HS.
21. Agregar 198 µL de solución de trabajo Qubit™ a un tubo de ensayo Qubit™ de 500 µL previamente etiquetado.
22. Agregar 2 µL de muestra de ADN y agitar vigorosamente durante 3 a 5 segundos.
23. Incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
24. Leer las muestras en el fluorómetro Qubit™ 2.0 (Invitrogen™).

ANEXO 2. Cebadores utilizados para la amplificación y preparación de librerías metagenómicas.

PCR	Name	Sequence	Length (pb)
First PCR	515F_L1_ph 0	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA	52
	515F_L1_ph 1	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA	53
	806R_L2_p h0	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTACHVGGGTWTCTAAT	54
	806R_L2_p h1	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCGGACTACHVGGGTWTCTAAT	55
	PE1-1	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTTGTCTG ACACCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	71
	PE2-1	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTAGCTTTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	66
	PE1-2	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACAGATCACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	70
	PE2-2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTCCAAGGGTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	66
	PE1-3	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATACCGACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	70

Second PCR	PE2-3	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATATCCGCTTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCT	66
	PE1-4	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCGGATTAACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT	70
	PE2-4	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCGGATTAACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT	66
	PE1-5	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACACGTGTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT	70
	PE2-5	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTGTCTGTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCT	66
	PE1-6	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTGTGTCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT	70
	PE2-6	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTACGGCTAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCT	66
	PE1-7	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTTGTCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT	70
	PE2-7	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGTTGCAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCT	66
	PE1-8	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCACTCAACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT	70
	PE2-8	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTGAAGTCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCT	66
	PE1-9	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGGAATTGGACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT	70
	PE2-9	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTCTCTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCT	66
	PE1-10	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTAGCTAGACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT	70
	PE2-10	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTCAAGACGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCT	66

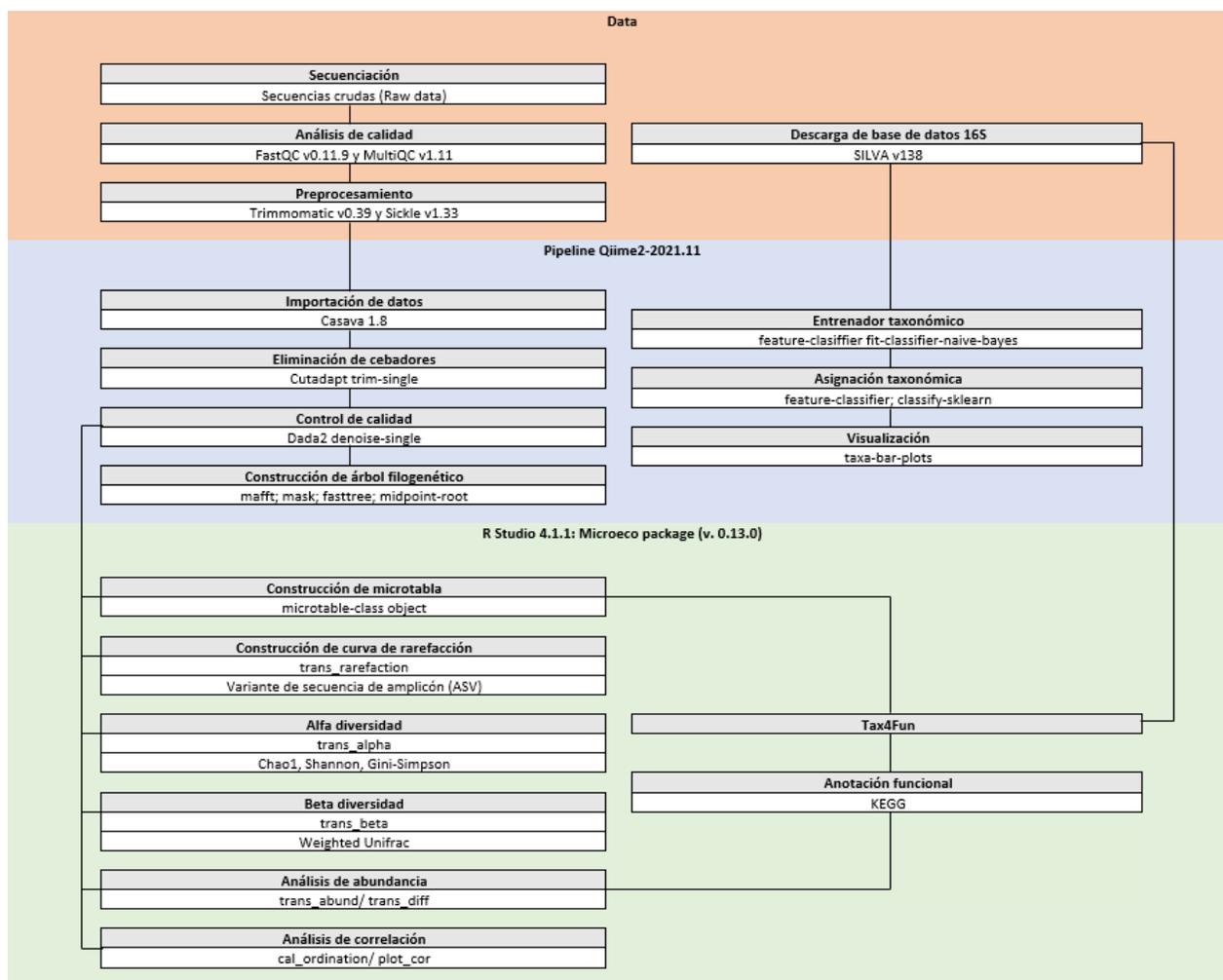
Protocolo de limpieza de librerías metagenómicas.

1. Mezclar 10 μ L de amplicón PCR2 con 8 μ L de perlas AMPure XP (Beckman Coulter) en un tubo de 0,2 mL estéril.
2. Incubar el tubo a temperatura ambiente durante 15 minutos.
3. Colocar el tubo en un soporte magnético durante 5 minutos.
4. Retirar con cuidado el sobrenadante y desecharlo.
5. Agregar 22 μ L de etanol al 80% recién preparado, sin mezclar e incubar durante 30 segundos.
6. Retirar con cuidado el sobrenadante y desecharlo.
7. Repetir los pasos 5 y 6.
8. Dejar que las perlas se sequen al aire durante 15 minutos sin retirar el tubo del soporte magnético.
9. Retirar el tubo del soporte magnético. Añadir 10 μ L de agua ultrapura. Agitar bien en el vórtex e incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente.
10. Colocar el tubo en el soporte magnético durante 5 minutos.
11. Transferir 30 μ L del sobrenadante (productos de PCR2 purificados) a un tubo de 0,2 mL previamente etiquetado.
12. Cuantificar el producto de PCR2 purificado en el fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen™).

Protocolo para el análisis de fragmentos.

1. Encender el equipo BiOptic QSEP-100.
2. Iniciar el software del equipo.
3. Tomar el cartucho S2 verticalmente y retirar los sellos de la tapa.
4. Tomar el alfiler del empaque del cartucho S2 y perforar la tapa.
5. Limpiar la punta del capilar con un paño fino.
6. Adicionar tampón de separación en el pozo 5.
7. Preparar el marcador de alineamiento, adicionando 20 μ L del marcador y 10 μ L de aceite mineral en un tubo de 0,2 mL.
8. Seleccionar la opción “Charge Buffer”.
9. Colocar el tubo del marcador de alineación de ADN en la posición MA1 y la bandeja tampón en el soporte de la bandeja.
10. Seleccionar la opción “Charge Sample” y abrir la puerta de la muestra para colocar las muestras (≥ 2 μ L) en A01. Asegúrese de que no haya burbujas de aire en la solución de muestra.
11. Desempacar e insertar el cartucho S2 dentro del equipo, asegurándose de que la compuerta esté bien cerrada.

12. Seleccionar la opción “Latch”.
13. Ajustar la posición de las muestras dentro del plato de muestras (por ejemplo, A01) en la y luego seleccionar “Aceptar”.
14. Ajustar la configuración del método (tipo de plato, marcador de alineamiento, tipo de cartucho, entre otros) e indicar la carpeta en la que quedarán alojados los resultados.
15. Seleccionar “Run” para iniciar el proceso.
16. Ver el resultado después de que se complete el proceso.



ANEXO 3. Flujo de trabajo bioinformático.

ANEXO 4. Resultados de los análisis fisicoquímicos de los suelos y concentración de Cdt y Cda.

Sample	Clays (%)	Texture	pH	Cda (mg.Kg ⁻¹)	Cdt (mg.Kg ⁻¹)	CICE (meq.100g ⁻¹)	Ca (meq.100g ⁻¹)	Cu (mg.Kg ⁻¹)	Fe (mg.Kg ⁻¹)	Zn (mg.Kg ⁻¹)	Mn (mg.Kg ⁻¹)	Mg (meq.100g ⁻¹)	K (meq.100g ⁻¹)	P (mg.Kg ⁻¹)	CO (%)
F1CRz	34	CL	6.21	10.24	14.967	20.55	17.83	nc	nc	nc	nc	2.08	0.64	63.75	8.69
F1CD1	26	CL	6.35	2.48	7.030	12.29	11.49	10.95	166.24	9.11	7.04	0.52	0.23	81.07	2.22
F1CD2	30	CL	6.78	2.29	6.937	14.65	14.10	10.61	155.05	10.14	9.02	0.33	0.19	69.43	1.88
F1WCD1	36	CL	5.71	0.32	2.137	8.33	7.58	2.57	124.81	1.20	7.35	0.46	0.15	5.54	1.22
F1WCD2	42	C	5.85	0.10	2.370	8.59	8.26	1.33	194.68	1.88	2.13	0.11	0.09	4.86	0.40

F2CRz	30	CL	4.60	0.53	1.750	9.29	6.82	nc	nc	nc	nc	2.20	0.26	31.50	2.65
F2CD1	29	CL	4.62	0.10	1.397	1.72	0.92	1.03	182.51	1.89	0.87	0.44	0.29	11.52	2.29
F2CD2	26	SCL	5.03	0.49	1.387	1.33	0.72	0.89	145.78	3.44	1.62	0.38	0.14	19.11	1.52
F2WCD1	19	L	4.58	0.12	1.890	2.45	1.52	1.39	271.92	4.03	2.15	0.61	0.17	10.40	3.09
F2WCD2	8	SiL	5.04	0.10	1.770	0.94	0.53	0.34	89.75	0.47	0.03	0.19	0.07	7.28	1.95
F3CD1	26	SL	4.94	0.14	1.457	5.65	4.24	0.84	141.13	1.00	2.89	0.98	0.35	119.60	3.22
F3CD2	25	SCL	4.62	0.19	1.863	2.49	1.95	0.96	161.44	1.09	1.93	0.36	0.09	160.40	1.08
F3WCD1	3	LS	5.10	0.96	4.487	5.00	3.29	1.40	235.62	6.77	3.86	1.28	0.27	165.67	6.01
F3WCD2	4	LS	5.54	0.33	5.840	2.18	1.80	0.57	62.63	1.26	2.37	0.19	0.07	124.00	2.51

Nota. CL, Clay Loam; C, Clay; SCL, Sandy Clay Loam; L, Loam; SiL: Silt Loam; SL, Sandy Loam; LS, Loam Sandy; nc, not calculated.

ANEXO 5. Diferencias entre propiedades fisicoquímicas y significancia estadística estimadas con Wilcoxon.

Comparación	Medida	Grupo	P.adj	Significancia
F1 - F2	Arcillas	F1	0.3388541848	ns
F1 - F3	Arcillas	F1	0.0365163647	*
F2 - F3	Arcillas	F2	0.1702515219	ns
F1 - F2	pH	F1	0.0002631440	***
F1 - F3	pH	F1	0.0005935281	***
F2 - F3	pH	F3	0.3388541848	ns
F1 - F2	Cda	F1	0.0072856790	**
F1 - F3	Cda	F1	0.0365163647	*
F2 - F3	Cda	F3	0.5119578263	ns
F1 - F2	Cdt	F1	0.0006868663	***
F1 - F3	Cdt	F1	0.0315165384	*
F2 - F3	Cdt	F3	0.2560860192	ns
F1 - F2	Ca	F1	0.0001188743	***
F1 - F3	Ca	F1	0.0001188743	***
F2 - F3	Ca	F3	0.3388541848	ns
F1 - F2	Mg	F2	0.9625554354	ns
F1 - F3	Mg	F3	0.8225816585	ns
F2 - F3	Mg	F3	0.8306253475	ns
F1 - F2	K	F1	0.4423800909	ns
F1 - F3	K	F3	0.6738891639	ns
F2 - F3	K	F3	0.9625554354	ns
F1 - F2	CICE	F1	0.0002726381	***
F1 - F3	CICE	F1	0.0002823264	***
F2 - F3	CICE	F3	0.3853178051	ns
F1 - F2	P	F1	0.4480140975	ns
F1 - F3	P	F3	0.0044216599	**
F2 - F3	P	F3	0.0000891557	***
F1 - F2	Cu	F1	0.0026910083	**
F1 - F3	Cu	F1	0.0044216599	**
F2 - F3	Cu	F3	0.9179463978	ns

F1 - F2	Fe	F2	0.3390481174	ns
F1 - F3	Fe	F3	0.9315220701	ns
F2 - F3	Fe	F2	0.3683078847	ns
F1 - F2	Mn	F1	0.0024509010	**
F1 - F3	Mn	F1	0.0234980219	*
F2 - F3	Mn	F3	0.2560860192	ns
F1 - F2	Zn	F1	0.0846588384	ns
F1 - F3	Zn	F1	0.1417478659	ns
F2 - F3	Zn	F2	0.9248314566	ns
F1 - F2	CO	F2	0.6864448026	ns
F1 - F3	CO	F3	0.4423800909	ns
F2 - F3	CO	F3	0.4423800909	ns

Nota. Diferencias significativas indicadas con asteriscos: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,001$; ns, no significativa.

ANEXO 6. Información sobre el número de secuencias por muestra obtenido antes y después de su procesamiento.

Muestra	Datos Crudos	Datos Limpios
F1CD1R1	130.431	68.256
F1CD1R2	55.349	25.970
F1CD1R3	72.671	33.777
F1CD2R1	137.149	87.624
F1CD2R2	29.556	13.420
F1CD2R3	87.492	42.656
F1CRzR1	157.431	74.588
F1CRzR2	106.931	101.244
F1CRzR3	78.892	72.477
F1WCD1R1	56.995	26.772
F1WCD1R2	75.947	39.650
F1WCD1R3	136.990	87.792
F1WCD2R1	163.638	77.187
F2CD1R1	105.948	69.365
F2CD1R2	102.383	62.911
F2CD1R3	100.403	58.204
F2CD2R1	79.557	51.666
F2CD2R2	114.368	73.126
F2CD2R3	114.915	74.724
F2CRzR1	157.431	91.678
F2CRzR2	106.931	46.166
F2CRzR3	78.892	40.460
F2WCD1R1	193.955	88.771

F2WCD1R2	71.833	29.635
F2WCD1R3	80.179	41.012
F2WCD2R1	140.419	96.376
F3CD1R1	120.247	72.654
F3CD1R2	115.230	68.663
F3CD1R3	134.317	80.492
F3CD2R1	121.867	71.068
F3CD2R2	99.727	59.725
F3CD2R3	126.023	75.823
F3WCD1R1	140.970	79.882
F3WCD1R2	103.680	58.461
F3WCD1R3	120.009	68.588
F3WCD2R1	106.357	57.532

ANEXO 7. Coeficientes de correlación de Spearman entre las variables fisicoquímicas y los índices de diversidad alfa.

Índice	Variable	Correlación	Significancia
Chao1	pH	0.035	ns
Shannon	pH	-0.076	ns
Simpson	pH	-0.001	ns
Chao1	Cda	0.303	ns
Shannon	Cda	0.214	ns
Simpson	Cda	0.120	ns
Chao1	Cdt	0.204	ns
Shannon	Cdt	0.149	ns
Simpson	Cdt	0.151	ns
Chao1	Ca	0.058	ns
Shannon	Ca	-0.012	ns
Simpson	Ca	0.090	ns
Chao1	CICE	0.092	ns
Shannon	CICE	0.010	ns
Simpson	CICE	0.077	ns
Chao1	P	0.147	ns
Shannon	P	0.227	ns
Simpson	P	0.120	ns
Chao1	Cu	0.033	ns
Shannon	Cu	-0.036	ns
Simpson	Cu	0.097	ns
Chao1	Mn	-0.060	ns
Shannon	Mn	-0.085	ns
Simpson	Mn	0.081	ns

Nota. Diferencias significativas indicadas con asteriscos: *, $p < 0,05$; * **, $p < 0,001$; ns, no significativa.

ANEXO 8. Resultados de la comparación entre sitios de muestreo mediante PERMANOVA.

Grupos	Medida	F	R2	P-Valor	P-Ajustado	Significancia
F1 Vs F2	Wei_Unifrac	5.935368	0.1982728	0.001	0.0015	**
F1 Vs F3	Wei_Unifrac	11.750414	0.3587857	0.001	0.0015	**
F2 Vs F3	Wei_Unifrac	2.631195	0.1113441	0.031	0.0310	*

Nota. Diferencias significativas indicadas con asteriscos: *, $p < 0,05$; * **, $p < 0,001$; ns, no significativa.

12 BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, S. Z., Rafatullah, M., Hossain, K., Ismail, N., Tajarudin, H. A., & Abdul Khalil, H. P. S. (2018). A review on mechanism and future perspectives of cadmium-resistant bacteria. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 15(1), 243–262.
- Abbas, S. Z., Rafatullah, M., Ismail, N., & Lalung, J. (2014). Isolation, identification, characterization, and evaluation of cadmium removal capacity of Enterobacter species. *Journal of basic microbiology*, 54(12), 1279-1287.
- Abellan-Schneyder, I., Matchado, M. S., Reitmeier, S., Sommer, A., Sewald, Z., Baumbach, J., List, M. & Neuhaus, K. (2021). Primer, pipelines, parameters: issues in 16S rRNA gene sequencing. *msphere*, 6(1), e01202-20.
- Abhauer, K. P., Wemheuer, B., Daniel, R., & Meinicke, P. (2015). Tax4Fun: predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. *Bioinformatics*, 31(17), 2882-2884.
- Agrawal, P. K., Agrawal, S., & Verma, S. K. (2011). Methods for studying microbial diversity from soyabean rhizosphere by phenotypic and molecular approach. *Advances in Applied Science Research*, 2(5), 538–545.
- Ahemad, M. (2012). Implications of bacterial resistance against heavy metals in bioremediation: A review. *IIOAB Journal*, 3(3), 39–46.
- Aislabie, J., Deslippe, J. R., & Dymond, J. R. (2013). Soil microbes and their contribution to soil services. *Ecosystem Services in New Zealand - Conditions and Trends, Lincoln, New Zealand*, 1(12), 143-161.
- Alexandrino, M., Costa, R., Canário, A. V., & Costa, M. C. (2014). Clostridia initiate heavy metal bioremoval in mixed sulfidogenic cultures. *Environmental science & technology*, 48(6), 3378-3385.
- Ali, Q., Ayaz, M., Yu, C., Wang, Y., Gu, Q., Wu, H., & Gao, X. (2022). Cadmium tolerant microbial strains possess different mechanisms for cadmium biosorption and immobilization in rice seedlings. *Chemosphere*, 135206.
- Al-Dhabi, N. A., Esmail, G. A., Ghilan, A. K. M., & Arasu, M. V. (2019). Optimizing the management of cadmium bioremediation capacity of metal-resistant pseudomonas sp. Strain al-dhabi-126 isolated from the industrial city of Saudi Arabian environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(23), 4788.
- Altowayti, W. A. H., Almoalemi, H., Shahir, S., & Othman, N. (2020). Comparison of culture-independent and dependent approaches for identification of native arsenic-resistant bacteria and their potential use for arsenic bioremediation. *Ecotoxicology and environmental safety*, 205, 111267.
- Arce-Inga, M., González-Pérez, A. R., Hernandez-Díaz, E., Chuquibala-Checan, B., Chavez-Jalk, A., Llanos-Gomez, K. J., Leiva-Espinoza, S. T., Oliva-Cruz, S. M. & Cumpa-

- Velasquez, L. M. (2022). Bioremediation Potential of Native *Bacillus* sp. Strains as a Sustainable Strategy for Cadmium Accumulation of *Theobroma cacao* in Amazonas Region. *Microorganisms*, *10*(11), 2108.
- Arévalo-Gardini, E., Obando-Cerpa, M. E., Zúñiga-Cernades, L. B., Arévalo-Hernández, C. O., Baligar, V., & He, Z. (2016). Metales pesados en suelos de plantaciones de cacao (*Theobroma cacao* L.) en tres regiones del Perú. *Ecología aplicada*, *15*(2), 81-89.
- Arévalo-Gardini, E., Arévalo-Hernández, C. O., Baligar, V. C., & He, Z. L. (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*, 792–800.
- Argüello, D., Chavez, E., Lauryssen, F., Vanderschueren, R., Smolders, E., & Montalvo, D. (2019). Soil properties and agronomic factors affecting cadmium concentrations in cacao beans: A nationwide survey in Ecuador. *Science of the total environment*, *649*, 120-127.
- Azaroual, S. E., Kasmi, Y., Aasfar, A., El Arroussi, H., Zeroual, Y., El Kadiri, Y., Zrhidri, A., Elfahime, E., Sefiani, A. & Meftah Kadmiri, I. (2022). Investigation of bacterial diversity using 16S rRNA sequencing and prediction of its functionalities in Moroccan phosphate mine ecosystem. *Scientific reports*, *12*(1), 1-16.
- Azeez, M. O., Adesanwo, O. O., & Adepetu, J. A. (2021). Effects of Copper Fungicides Spray on Nutrient Contents in Soils of Cocoa Growing Areas of Southwestern Nigeria. *Tanzania Journal of Science*, *47*(5), 1546-1559.
- Bagheri, R., Bashir, H., Ahmad, J., Baig, A., & Qureshi, M. I. (2014). Effects of Cadmium Stress on Plants. *Environmental sustainability: concepts, principles, evidences and innovations*, 271–277.
- Bakker, P. A., Berendsen, R. L., Doornbos, R. F., Wintermans, P. C., & Pieterse, C. M. (2013). The rhizosphere revisited: root microbiomics. *Frontiers in plant science*, *4*, 165.
- Beattie, R. E., Henke, W., Campa, M. F., Hazen, T. C., McAliley, L. R., & Campbell, J. H. (2018). Variation in microbial community structure correlates with heavy-metal contamination in soils decades after mining ceased. *Soil Biology and Biochemistry*, *126*, 57-63.
- Beg, M. S., Ahmad, S., Jan, K., & Bashir, K. (2017). Status, supply chain and processing of cocoa - A review. *Trends in Food Science and Technology*, *66*, 108–116.
- Bigalke, M., Ulrich, A., Rehmus, A., & Keller, A. (2017). Accumulation of cadmium and uranium in arable soils in Switzerland. *Environmental Pollution*, *221*, 85–93.
- 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*, 128–139.
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Harriet, A., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Asker Brejnrod, Colin J. Brislawn, C. Tito Brown, Benjamín J. Callahan, Caraballo Rodríguez, A. M., Chase, J., Cope, E. K., Da Silva, R., Diener, C., Dorrestein, P. C.,

- Douglas, G. M. & Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*, 37(8), 852-857.
- Bouzat, J. L., & Hoostal, M. J. (2013). Evolutionary analysis and lateral gene transfer of two-component regulatory systems associated with heavy-metal tolerance in bacteria. *Journal of molecular evolution*, 76(5), 267-279.
- Bravo, D., & Braissant, O. (2022). Cadmium-tolerant bacteria: current trends and applications in agriculture. *Letters in applied microbiology*, 74(3), 311-333.
- Bravo, D., Leon-Moreno, C., Martínez, C. A., Varón-Ramírez, V. M., Araujo-Carrillo, G. A., Vargas, R., Quiroga-Mateus, R., Zamora, A. & Rodríguez, E. A. G. (2021a). The first national survey of cadmium in cacao farm soil in Colombia. *Agronomy*, 11(4), 761.
- Bravo, D., Pardo-Díaz, S., Benavides-Eraza, J., Rengifo-Estrada, G., Braissant, O., & Leon-Moreno, C. (2018). Cadmium and cadmium-tolerant soil bacteria in cacao crops from northeastern Colombia. *Journal of applied microbiology*, 124(5), 1175-1194.
- Bravo, D., Santander, M., Rodríguez, J., & Escobar, S. (2021b). Cadmium in Cacao: 'From Soil to Bar' the Journey of Cadmium at a Farm Level. *Research Square*, 1-16.
- Breitwieser, F. P., Lu, J., & Salzberg, S. L. (2018). A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), 1125–1136.
- Cáceres, J. (2017). *Microorganismos cultivables asociados a cadmio (Cd) presentes en suelos cacaoteros de los municipios de Yacopí y Nilo, como estrategia de biorremediación* [Trabajo de grado]. Universidad Nacional de Colombia.
- Cáceres, P. F. F., Vélez, L. P., Junca, H., & Moreno-Herrera, C. X. (2021). Theobroma cacao L. 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. *Current research in microbial sciences*, 2, 100086.
- Callahan Jr, M. A., & Stanturf, J. A. (2021). Soil ecology and restoration science. *In Soils and Landscape Restoration* (pp. 39-62). Academic Press.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(Supplement 1), 4516–4522.
- Charrupi Riascos, N., & Martínez Novoa, D. C. (2017). *Estudio ambiental del cadmio y su relación con suelos destinados al cultivo de cacao en los departamentos de Arauca y Nariño* [Trabajo de grado]. Universidad de La Salle.
- Chavez, E., He, Z. L., Stoffella, P. J., Mylavarapu, R. S., Li, Y. C., Moyano, B., & Baligar, V. C. (2015). Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *Science of the Total Environment*, 533, 205–214.

- Chellaiah, E. R. (2018). Cadmium (heavy metals) bioremediation by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. *Applied Water Science*, 8(6), 154.
- Chen, Y. P., Liu, Q., Liu, Y. J., Jia, F. A., & He, X. H. (2014). Responses of soil microbial activity to cadmium pollution and elevated CO₂. *Scientific Reports*, 4, 4287.
- Chu, D. (2018). Effects of heavy metals on soil microbial community. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 113, p. 012009).
- Cordoba-Novoa, H. A., Cáceres-Zambrano, J., & Torres-Rojas, E. (2021). Assessment of native cadmium-resistant bacteria in cacao (*Theobroma cacao* L.)-cultivated soils. *BioRxiv*.
- Cota-Ruiz, K., López de los Santos, Y., Hernández-Viezcas, J. A., Delgado-Rios, M., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2019). A comparative metagenomic and spectroscopic analysis of soils from an international point of entry between the US and Mexico. *Environment International*, 123, 558–566.
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P. & Andersen, G. L. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and environmental microbiology*, 72(7), 5069-5072.
- De Souza, P. A., Moreira, L. F., Sarmiento, D. H., & da Costa, F. B. (2018). Cacao—*Theobroma cacao*. *Exotic fruits*, 69-76.
- Deng, Y., Fu, S., Sarkodie, E. K., Zhang, S., Jiang, L., Liang, Y., Bai, L., Liu, X., Liu, H. & Jiang, H. (2022). Ecological responses of bacterial assembly and functions to steep Cd gradient in a typical Cd-contaminated farmland ecosystem. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 229, 113067.
- Doerge, T., Kitchen, N. R., & Lund, E. D. (2015). Mapeo de Conductividad Eléctrica del suelo. *Traducido y adaptado para Colombia por Alberto Lobo-Guerrero Sanz, LOGEMIN SA Fecha de consulta, 16(04), 2015.*
- Du, Y., Zhang, D., Zhou, D., Liu, L., Wu, J., Chen, H., Jin, D. & Yan, M. (2021). The growth of plants and indigenous bacterial community were significantly affected by cadmium contamination in soil–plant system. *AMB Express*, 11(1), 1-13.
- Ducret, V., Gonzalez, M. R., Leoni, S., Valentini, M., & Perron, K. (2020). The CzcCBA efflux system requires the CadA P-type ATPase for timely expression upon zinc excess in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in microbiology*, 11, 911.
- Edwards, C. D., Beatty, J. C., Loisel, J. B., Vlassov, K. A., & Lefebvre, D. D. (2013). Aerobic transformation of cadmium through metal sulfide biosynthesis in photosynthetic microorganisms. *BMC Microbiology*, 13(1), 1–11.
- El Baz, S., Baz, M., Barakate, M., Hassani, L., El Gharmali, A., & Imziln, B. (2015). Resistance to and accumulation of heavy metals by actinobacteria isolated from abandoned mining areas. *The Scientific World Journal*, 2015.
- El Rasafi, T., Oukarroum, A., Haddioui, A., Song, H., Kwon, E. E., Bolan, N., Tack, F. M.

- G., Sebastian, A., Prasad, M. N. V. & Rinklebe, J. (2022). Cadmium stress in plants: A critical review of the effects, mechanisms, and tolerance strategies. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 52(5), 675-726.
- Epelde, L., Lanzen, A., Blanco, F., Urich, T., & Garbisu, C. (2015). Adaptation of soil microbial community structure and function to chronic metal contamination at an abandoned Pb-Zn mine. *FEMS microbiology ecology*, 91(1), 1-11.
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Källér, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047-3048.
- Fabian, J., Zlatanovic, S., Mutz, M., & Premke, K. (2017). Fungal-bacterial dynamics and their contribution to terrigenous carbon turnover in relation to organic matter quality. *ISME Journal*, 11(2), 415–425.
- Fakruddin, M., & Mannan, K. (2013). Methods for analyzing diversity of microbial communities in natural environments. *Ceylon Journal of Science (Biological Sciences)*, 42(1), 19–33.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (2019). *Portal de suelos de la FAO*. <https://www.fao.org/3/ca7165en/ca7165en.pdf>.
- Fashola, M. O., Ngole-Jeme, V. M., & Babalola, O. O. (2016). Heavy metal pollution from gold mines: Environmental effects and bacterial strategies for resistance. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(11), 1047.
- FEDECACAO (Federación Nacional de Cacaoteros). (2021). *Año cacaotero 2020-2021, el de mayor producción de cacao en la historia de Colombia*. Recuperado el día 28 de octubre de 2022, de <https://www.fedecacao.com.co/post/a%C3%B1o-cacaotero-2020-2021-el-de-mayor-producci%C3%B3n-de-cacao-en-la-historia-de-colombia>.
- Feng, G., Xie, T., Wang, X., Bai, J., Tang, L., Zhao, H., Wei, W., Wang, M., & Zhao, Y. (2018). Metagenomic analysis of microbial community and function involved in cd-contaminated soil. *BMC Microbiology*, 18(1), 11.
- 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.
- Fierros-Romer, G., Gómez-Ramírez, M., Arenas-Isaac, G. E., Pless, R. C., & Rojas-Avelizapa, N. G. (2016). Identification of *Bacillus megaterium* and *Microbacterium liquefaciens* genes involved in metal resistance and metal removal. *Canadian Journal of Microbiology*, 62(6), 505–513.
- FINAGRO (Fondo para el Financiamiento del Sector Agropecuario). (2020). Ficha de inteligencia: Cacao. https://www.finagro.com.co/sites/default/files/ficha_de_inteligencia_-_cacao.pdf
- Flórez-Peláez, L. A., & Gómez-Sanabria, J. Z. (2019). *Determinación de los niveles de*

cadmio en suelos de plantaciones de cacao (Theobroma cacao L.) ubicadas en la vereda la Esmeralda en el municipio de San Vicente de Chucurí, Santander [Trabajo de grado]. Universidad de Pamplona.

- Florida-Rofner, N. (2021). Revisión sobre límites máximos de cadmio en cacao (*Theobroma cacao* L.). *LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida*, 34(2), 117-130.
- Gagelidze, N. A., Amiranashvili, L. L., Sadunishvili, T. A., Kvesitadze, G. I., Urushadze, T. F., and Kvrivishvili, T. O. (2018). Bacterial composition of different types of soils of Georgia. *Annals of Agrarian Science*, 16(1), 17-21.
- Genchi, G., Sinicropi, M. S., Lauria, G., Carocci, A., & Catalano, A. (2020). The effects of cadmium toxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(11), 3782.
- Giachino, A., & Waldron, K. J. (2020). Copper tolerance in bacteria requires the activation of multiple accessory pathways. *Molecular microbiology*, 114(3), 377-390.
- Gil, J. P., López-Zuleta, S., Quiroga-Mateus, R. Y., Benavides-Erazo, J., Chaali, N., & Bravo, D. (2022). Cadmium distribution in soils, soil litter and cacao beans: a case study from Colombia. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 19(4), 2455-2476.
- Girdhar, M., Tabassum, Z., Singh, K., & Mohan, A. (2022). A Review on the Resistance and Accumulation of Heavy Metals by Different Microbial Strains. *Biodegradation Technology of Organic and Inorganic Pollutants*, 219.
- Gramlich, A., Tandy, S., Andres, C., Chincheros Paniagua, J., Armengot, L., Schneider, M., & Schulin, R. (2017). Cadmium uptake by cocoa trees in agroforestry and monoculture systems under conventional and organic management. *Science of the Total Environment*, 580, 677–686.
- 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.
- Groisman, E. A. (2016). Feedback control of two-component regulatory systems. *Annual Review of Microbiology*, 70, 103.
- 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 and Environmental Safety*, 144, 300–306.
- Gupta, P., & Diwan, B. (2017). Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnology Reports*, 13, 58–71.
- Haegeman, B., Hamelin, J., Moriarty, J., Neal, P., Dushoff, J., & Weitz, J. S. (2013). Robust estimation of microbial diversity in theory and in practice. *The ISME journal*, 7(6), 1092-1101.
- Haider, F. U., Liqun, C., Coulter, J. A., Cheema, S. A., Wu, J., Zhang, R., Wenjun, M. &

- Farooq, M. (2021). Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 211, 111887.
- Hajar, E. W. I., Sulaiman, A. Z. B., & Sakinah, A. M. (2014). Assessment of heavy metals tolerance in leaves, stems and flowers of *Stevia rebaudiana* plant. *Procedia Environmental Sciences*, 20, 386-393.
- Hall, R. (2008). *Soil essentials: managing your farm's primary asset*. Landlinks Press.
- Hazelton, P., & Murphy, B. (2016). *Interpreting soil test results: What do all the numbers mean?*. CSIRO publishing.
- Hermans, S. M., Buckley, H. L., Case, B. S., Curran-Cournane, F., Taylor, M., & Lear, G. (2020). Using soil bacterial communities to predict physico-chemical variables and soil quality. *Microbiome*, 8(1), 1–13.
- Hinsu, A., Dumadiya, A., Joshi, A., Kotadiya, R., Andharia, K., Koringa, P., & Kothari, R. (2021). To culture or not to culture: a snapshot of culture-dependent and culture-independent bacterial diversity from peanut rhizosphere. *PeerJ*, 9, e12035.
- Hong, C., Si, Y., Xing, Y., & Li, Y. (2015). Illumina MiSeq sequencing investigation on the contrasting soil bacterial community structures in different iron mining areas. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(14), 10788-10799.
- Hou, D., Lin, Z., Wang, R., Ge, J., Wei, S., Xie, R., Wang, H., Wang, K., Hu, Y., Yang, X., Lu, L. & Tian, S. (2018). Cadmium exposure-sedum alfredii planting interactions shape the bacterial community in the hyperaccumulator plant rhizosphere. *Applied and environmental microbiology*, 84(12), e02797-17.
- Hrynkiewicz, K., Złoch, M., Kowalkowski, T., Baum, C., Niedojadło, K., & Buszewski, B. (2015). Strain-specific bioaccumulation and intracellular distribution of Cd²⁺ in bacteria isolated from the rhizosphere, ectomycorrhizae, and fruitbodies of ectomycorrhizal fungi. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(4), 3055-3067.
- Huamaní-Yupanqui, H. A., Mansilla-Minaya, L. G., Florida-Rofner, N., & Neira-Trujillo, G. M. (2012). Presence of heavy metals in organic cacao (*Theobroma cacao* L.) crop. *Acta Agronómica*, 61(4), 339-344.
- Hugerth, L. W., & Andersson, A. F. (2017). Analysing microbial community composition through amplicon sequencing: from sampling to hypothesis testing. *Frontiers in microbiology*, 8, 1561.
- Hussain, S., Khan, M., Sheikh, T. M. M., Mumtaz, M. Z., Chohan, T. A., Shamim, S., & Liu, Y. (2022). Zinc essentiality, toxicity, and its bacterial bioremediation: A comprehensive insight. *Frontiers in Microbiology*, 1912.
- Husson, O. (2013). Redox potential (Eh) and pH as drivers of soil/plant/microorganism systems: a transdisciplinary overview pointing to integrative opportunities for agronomy. *Plant and Soil*, 362(1), 389-417.
- ICCO (International Cocoa Organization). (2021). *COCOA MARKET REPORT MAY 2021*.

<https://www.icco.org/wp-content/uploads/ICCO-Monthly-Cocoa-Market-Report-May-2021.pdf>.

Icgen, B., & Yilmaz, F. (2016). Design a cadA-targeted DNA probe for screening of potential bacterial cadmium biosorbents. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(6), 5743–5752.

IGAC “Instituto Geográfico” Agustín Codazzi.” Subdirección Agrológica, & Colombia. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. (2000). Estudio general de suelos y zonificación de tierras del Departamento de Cundinamarca (Vol. 2). Instituto Geográfico Agustín Codazzi, Subdirección de Agrología.

Igiri, B. E., Okoduwa, S. I., Idoko, G. O., Akabuogu, E. P., Adeyi, A. O., & Ejiogu, I. K. (2018). Toxicity and bioremediation of heavy metals contaminated ecosystem from tannery wastewater: a review. *Journal of toxicology*, 2018.

Ismael, M. A., Elyamine, A. M., Moussa, M. G., Cai, M., Zhao, X., & Hu, C. (2019). Cadmium in plants: uptake, toxicity, and its interactions with selenium fertilizers. *Metallomics*, 11(2), 255-277.

INVIMA (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos). (2018). *Programa nacional de vigilancia y control de cadmio en productos derivados del cacao (licor de cacao, chocolate de mesa, cacao en polvo y chocolatina de leche) (2016-2017)*. <https://www.invima.gov.co/documents/20143/441038/Documento-tecnico-Cadmio-en-cacao.pdf/36200805-c21d-c444-ee08-47a0f6c8c230>.

Jahurul, M. H. A., Zaidul, I. S. M., Norulaini, N. A. N., Sahena, F., Jinap, S., Azmir, J., Sharif, K. M., & Mohd Omar, A. K. (2012). Cocoa butter fats and possibilities of substitution in food products concerning cocoa varieties, alternative sources, extraction methods, composition, and characteristics. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 467–476.

Jain, S., & Bhatt, A. (2014). Molecular and in situ characterization of cadmium-resistant diversified extremophilic strains of *Pseudomonas* for their bioremediation potential. *3 Biotech*, 4(3), 297–304.

Jebril, N., Boden, R., & Braungardt, C. (2022). Cadmium resistant bacteria mediated cadmium removal: a systematic review on resistance, mechanism and bioremediation approaches. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1002(1), 012006.

Jhonson, C. (2009). *Biology of soil science*. Oxford Book Company.

Jiao, W., Chen, W., Chang, A. C., & Page, A. L. (2012). Environmental risks of trace elements associated with long-term phosphate fertilizers applications: a review. *Environmental pollution*, 168, 44-53.

Joshi N. A., Fass J. N. (2011). Sickel: a Sliding-Window, Adaptive, Quality-Based Trimming Tool for FastQ Files (Version 1.33) [Software]. <https://github.com/najoshi/sickle>.

Jurasinski, G., Retzer, V., & Beierkuhnlein, C. (2009). Inventory, differentiation, and proportional diversity: A consistent terminology for quantifying species diversity.

Oecologia, 159(1), 15–26.

- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 28(1), 27-30.
- Kanu, A. S., Ashraf, U., Mo, Z., Fuseini, I., Mansaray, L. R., Duan, M., Pan, S. & Tang, X. (2017). Cadmium uptake and distribution in fragrant rice genotypes and related consequences on yield and grain quality traits. *Journal of Chemistry*, 2017.
- Kaviya, N., Upadhayay, V. K., Singh, J., Khan, A., Panwar, M., & Singh, A. V. (2019). Role of Microorganisms in Soil Genesis and Functions. In *Mycorrhizosphere and Pedogenesis* (pp. 25–52). Springer, Singapore.
- Kekane, S. S., Chavan, R. P., Shinde, D. N., Patil, C. L., & Sagar, S. S. (2015). A review on physicochemical properties of soil. *International Journal of Chemical Studies*, 3(4), 29-32.
- Khan, Z., Elahi, A., Bukhari, D. A., & Rehman, A. (2022). Cadmium sources, toxicity, resistance and removal by microorganisms-A potential strategy for cadmium eradication. *Journal of Saudi Chemical Society*, 101569.
- Khan, Z., Rehman, A., Hussain, S. Z., Nisar, M. A., Zulfqar, S., & Shakoori, A. R. (2016). Cadmium resistance and uptake by bacterium, *Salmonella enterica* 43C, isolated from industrial effluent. *AMB Express*, 6(1), 54.
- Khatoon, H., Solanki, P., Narayan, M., Tewari, L., Rai, J., & Hina Khatoon, C. (2017). Role of microbes in organic carbon decomposition and maintenance of soil ecosystem. *International Journal of Chemical Studies*, 5(6), 1648–1656.
- Kim, B. R., Shin, J., Guevarra, R. B., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K. H., Lee, J. H., Kim, H. B. & Isaacson, R. E. (2017). Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(12), 2089-2093.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., et al. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res*, 41(1), e1-e1.
- Kubier, A., Wilkin, R. T., & Pichler, T. (2019). Cadmium in soils and groundwater: A review. *Applied Geochemistry*, 108, 104388.
- Kumar Awasthi, M., Ravindran, B., Sarsaiya, S., Chen, H., Wainaina, S., Singh, E., Liu, T., Kumar, S., Pandey, A., Singh, L., & Zhang, Z. (2020). Metagenomics for taxonomy profiling: tools and approaches. *Bioengineered*, 11(1), 356–374.
- Küpper, H., & Leitenmaier, B. (2013). Cadmium-accumulating plants. *Cadmium: from toxicity to essentiality*, 373-393.
- Lagos, L., Maruyama, F., Nannipieri, P., Mora, M. L., Ogram, A., & Jorquera, M. A. (2015). Current overview on the study of bacteria in the rhizosphere by modern molecular techniques: a mini–review. *Journal of soil science and plant nutrition*, 15(2), 504-523.
- Langille, M. G. I., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A.,

- Clemente, J. C., Burkepille, D. E., Vega Thurber, R. L., Knight, R., Beiko, R. G., & Huttenhower, C. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, *31*(9), 814–821.
- Lehmann, A., Zheng, W., & Rillig, M. C. (2017). Soil biota contributions to soil aggregation. *Nature Ecology and Evolution*, *1*(12), 1828–1835.
- Lewis, C., Lennon, A. M., Eudoxie, G., & Umaharan, P. (2018). Genetic variation in bioaccumulation and partitioning of cadmium in *Theobroma cacao* L. *Science of the Total Environment*, *640*, 696–703.
- Li, L. Z., Tu, C., Peijnenburg, W. J., & Luo, Y. M. (2017). Characteristics of cadmium uptake and membrane transport in roots of intact wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Environmental Pollution*, *221*, 351-358.
- Li, S., Du, X., Feng, K., Wu, Y., He, Q., Wang, Z., Liu, Y., Wang, D., Peng, X., Zhang, Z., Escalas, A., Qu, Y. & Deng, Y. (2022). Assessment of microbial α -diversity in one meter squared topsoil. *Soil Ecology Letters*, *4*(3), 224-236.
- Lin, Y., Ye, Y., Hu, Y., & Shi, H. (2019). The variation in microbial community structure under different heavy metal contamination levels in paddy soils. *Ecotoxicology and environmental safety*, *180*, 557-564.
- Liu, P., Chen, X., Huang, Q., & Chen, W. (2015). The role of CzcRS two-component systems in the heavy metal resistance of *Pseudomonas putida* X4. *International journal of molecular sciences*, *16*(8), 17005-17017.
- Liu, C., Cui, Y., Li, X., & Yao, M. (2021). microeco: an R package for data mining in microbial community ecology. *FEMS microbiology ecology*, *97*(2), fiae255.
- Lin, J., Gao, X., Zhao, J., Zhang, J., Chen, S., & Lu, L. (2020). Plant Cadmium Resistance 2 (SaPCR2) facilitates cadmium efflux in the roots of hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance. *Frontiers in plant science*, *11*, 568887.
- Liu, Y. X., Qin, Y., Chen, T., Lu, M., Qian, X., Guo, X., & Bai, Y. (2021). A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. *Protein & cell*, *12*(5), 315-330.
- Liu, H., Wang, C., Xie, Y., Luo, Y., Sheng, M., Xu, F., & Xu, H. (2020). Ecological responses of soil microbial abundance and diversity to cadmium and soil properties in farmland around an enterprise-intensive region. *Journal of hazardous materials*, *392*, 122478.
- Liu, Y., Xiao, T., Ning, Z., Li, H., Tang, J., & Zhou, G. (2013). High cadmium concentration in soil in the Three Gorges region: Geogenic source and potential bioavailability. *Applied Geochemistry*, *37*, 149–156.
- Liu, H., Zhang, Y., Wang, Y., Xie, X., & Shi, Q. (2021). The connection between *czc* and *cad* systems involved in cadmium resistance in *Pseudomonas putida*. *International journal of molecular sciences*, *22*(18), 9697.
- López, M., & Estrada, H. (2015). Propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. *Bioagrobiencias*, *8*(1), 3-11.

- Lucaciu, R., Pelikan, C., Gerner, S. M., Zioutis, C., Köstlbacher, S., Marx, H., Herbold, C. W., Schmidt, H. & Rattei, T. (2019). A bioinformatics guide to plant microbiome analysis. *Frontiers in plant science*, *10*, 1313.
- Luo, L. Y., Xie, L. L., Jin, D. C., Mi, B. B., Wang, D. H., Li, X. F., Dai, X. Z., Zou, X. X., Zhang, Z., Ma, Y. Q., & Liu, F. (2019). Bacterial community response to cadmium contamination of agricultural paddy soil. *Applied Soil Ecology*, *139*, 100–106.
- Lux, A., Martinka, M., Vaculík, M., & White, P. J. (2011). Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *Journal of experimental botany*, *62*(1), 21-37.
- Maddela, N. R., Kakarla, D., García, L. C., Chakraborty, S., Venkateswarlu, K., & Megharaj, M. (2020). Cocoa-laden cadmium threatens human health and cacao economy: A critical view. *Science of the Total Environment*, *720*, 137645.
- Mandal, P. K., Biswas, A. K., Choi, K., & Pal, U. K. (2011). Methods for rapid detection of foodborne pathogens: An overview. *American Journal of Food Technology*, *6*(2), 87–102.
- Marrero-coto, J., & Coto-pérez, A. D. O. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC*, *41*(1), 67–78.
- Mayer, M., Prescott, C. E., Abaker, W. E., Augusto, L., Cécillon, L., Ferreira, G. W., James, J., Jandl, R., Katzensteiner, K., Laclau, J. P., Laganière, J., Nouvellon, Y., Paré, D., Stanturf, J. A., Vanguelova, E. I. & Vesterdal, L. (2020). Tamm Review: Influence of forest management activities on soil organic carbon stocks: A knowledge synthesis. *Forest Ecology and Management*, *466*, 118127.
- McDonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., Nawrocki, E. P., DeSantis, T. Z., Probst, A., Andersen, G. L., Knight, R. & Hugenholtz, P. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *The ISME journal*, *6*(3), 610-618.
- Mertoglu, B., Semerci, N., Guler, N., Calli, B., Cecen, F., & Saatci, A. M. (2008). Monitoring of population shifts in an enriched nitrifying system under gradually increased cadmium loading. *Journal of Hazardous Materials*, *160*(2-3), 495-501.
- Meter, A., Atkinson, R., & LABiberte, B. (2019). *Cadmio en el cacao de America Latina y el Caribe*. <https://core.ac.uk/download/pdf/224976826.pdf>.
- Mite, F., Carrillo, M., & Durando, W. (2010). Avances del monitoreo de presencia de cadmio en almendras de cacao, suelos y aguas de ecuador. *XII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del suelo*. <http://www.secsuelo.org/wp-content/uploads/2015/06/6.-Francisco-Mite.-Cadmio.-INIAP.pdf>
- Montaña Lara, J. S. (2015). *Aproximación metagenómica para la identificación de enzimas lipolíticas en suelo de bosque alto andino del parque nacional natural los nevados* [Trabajo de grado]. Pontificia Universidad Javeriana.
- Muhammad, I., Puschenreiter, M., & Wenzel, W. W. (2012). Cadmium and Zn availability as affected by pH manipulation and its assessment by soil extraction, DGT and indicator

plants. *Science of the Total Environment*, 416, 490-500.

- Muzammil, S., Siddique, M. H., Mureed, F., Andleeb, R., Jabeen, F., Waseem, M., ... & Ashraf, A. (2020). Assessment of cadmium tolerance and biosorptive potential of *Bacillus Cereus* GCFSD01 isolated from cadmium contaminated soil. *Brazilian Journal of Biology*, 81, 398-405.
- Naorem, A., Maverick, J., Singh, P., & Udayana, S. K. (2021). Microbial community structure in organic farming and their management. In *Advances in Organic Farming* (pp. 47-58). Woodhead Publishing.
- Nunes, I., Jacquioud, S., Brejnrod, A., Holm, P. E., Johansen, A., Brandt, K. K., Priemé, A. & Sørensen, S. J. (2016). Coping with copper: legacy effect of copper on potential activity of soil bacteria following a century of exposure. *FEMS microbiology ecology*, 92(11).
- Nwaehiri, U. L., Akwukwaegbu, P. I., & Nwoke, B. E. B. (2020). Bacterial remediation of heavy metal polluted soil and effluent from paper mill industry. *Environmental Analysis, Health and Toxicology*, 35(2).
- Oliva, M., Rubio, K., Epquin, M., Marlo, G., & Leiva, S. (2020). Cadmium uptake in native cacao trees in agricultural lands of Bagua, Peru. *Agronomy*, 10(10), 1551.
- Osorio, N. (2012). Cómo interpretar los resultados del análisis de fertilidad del suelo. *Boletín del Manejo Integral del Suelo y la Nutrición Vegetal-Universidad Nacional de Colombia*, 1(3).
- Osman, K. T. (2013). Physical properties of soil. *Soils*, 49-65.
- Osman, G. E. H., Abulreesh, H. H., Elbanna, K., Shaaban, M. R., Samreen, & Ahmad, I. (2019). Recent progress in metal-microbe interactions: Prospects in bioremediation. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 13(1), 13–26.
- Oulas, A., Pavloundi, C., Polymenakou, P., Pavlopoulos, G. A., Papanikolaou, N., Kotoulas, G., Arvanitidis, C., & Iliopoulos, I. (2015). Metagenomics: Tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. *Bioinformatics and Biology Insights*, 9, BBI-S12462.
- Pandey, S., Ghosh, P. K., Ghosh, S., De, T. K., & Maiti, T. K. (2013). Role of heavy metal resistant *Ochrobactrum* sp. and *Bacillus* spp. strains in bioremediation of a rice cultivar and their PGPR like activities. *Journal of Microbiology*, 51(1), 11-17.
- Paulo, L. M., Ramiro-Garcia, J., van Mourik, S., Stams, A. J., & Sousa, D. Z. (2017). Effect of nickel and cobalt on methanogenic enrichment cultures and role of biogenic sulfide in metal toxicity attenuation. *Frontiers in microbiology*, 8, 1341.
- Pérez, L., Martínez, A., Salgado, I., Valdés, L. A., Cruz, M., Allende, S., Collazo, O., Liva, M., & Carballo, M. E. (2020). Zinc and cadmium removal by bacteria : Study of factors associated to the process. *Tecnología y Ciencias Del Agua*, 11(3), 309–341.
- Plan Departamental de Extensión Agropecuaria- PDEA 2020. <https://www.adr.gov.co/wp-content/uploads/2021/07/PDEA-Cundinamarca.pdf>.
- Prakash, N., Latha, S., Sudha, P. N., & Renganathan, N. G. (2013). Influence of clay on the

adsorption of heavy metals like copper and cadmium on chitosan. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(2), 925-938.

- Pratama, I. B., Setyawan, C., Keiblinger, K., Maftukhah, R., & Mentler, A. (2022, December). Correlation between soil characteristics and cadmium content in aboveground of cacao farming in Nglangeran village, Gunung Kidul-Indonesia. *In International Conference on Sustainable Environment, Agriculture and Tourism (ICOSEAT 2022)* (pp. 453-464). Atlantis Press.
- Porcheron, G., Garénaux, A., Proulx, J., Sabri, M., & Dozois, C. M. (2013). Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, 90.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F. O. & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41(D1), D590-D596.
- Quezada-Hinojosa, R. P., Föllmi, K. B., Verrecchia, E., Adatte, T., & Matera, V. (2015). Speciation and multivariable analyses of geogenic cadmium in soils at Le Gurnigel, Swiss Jura Mountains. *Catena*, 125, 10–32.
- Quiroga-Mateus, R., López-Zuleta, S., Chávez, E., & Bravo, D. (2022). Cadmium-Tolerant Bacteria in Cacao Farms from Antioquia, Colombia: Isolation, Characterization and Potential Use to Mitigate Cadmium Contamination. *Processes*, 10(8), 1457.
- Rahimzadeh, M. R., Rahimzadeh, M. R., Kazemi, S., & Moghadamnia, A. A. (2017). Cadmium toxicity and treatment: An update. *Caspian Journal of Internal Medicine*, 8(3), 135.
- Rainey, F., Kämpfer, P., Trujillo, M., Chun, J., & DeVos, P. (2015). *Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria* (Vol. 410). W. B. Whitman (Ed.). Hoboken, NJ: Wiley.
- Raynaud, X., & Nunan, N. (2014). Spatial ecology of bacteria at the microscale in soil. *PLoS ONE*, 9(1), e87217.
- Renu, S., Sarim, K. M., Singh, D. P., Sahu, U., Bhojar, M. S., Sahu, A., Kahur, B., Gupta, A., Mandal, A., Thakur, J. K., Maná, M. C. & Saxena, A. K. (2021). Deciphering Cadmium (Cd) Tolerance in Newly Isolated Bacterial Strain, *Ochrobactrum intermedium* BB12, and Its Role in Alleviation of Cd Stress in Spinach Plant (*Spinacia oleracea* L.). *Frontiers in microbiology*, 12, 758144-758144.
- Rodríguez Albarrcín, H. S. (2017). *Dinámica del cadmio en suelos con niveles altos del elemento, en zonas productoras de cacao de Nilo y Yacopí, Cundinamarca* [Trabajo de grado]. Universidad Nacional de Colombia.
- Rodríguez S, Darghan A, Henao M. (2019). Spatial regression modeling of soils with high cadmium content in a cocoa producing area of Central Colombia. *Geoderma Regional*, 16, e00214.

- Rodríguez, N., McLaughlin, M., & Pennock, D. (2019). La contaminación del suelo: una realidad oculta. *Roma, FAO*.
- Rofner, N. F. (2021). Cadmium in soil and cacao beans of Peruvian and South American origin. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 74(2).
- Rojas, F., & Sacristán, E. J. (2013). *Guía ambiental para el cultivo del cacao* (No. PDF 1025)
- Rosales-Huamani, J. A., Breña-ore, J. L., & Sespedes-varkarsel, S. (2020). Study to Determine Levels of Cadmium in Cocoa Crops Applied to Inland Areas of Peru : “ The Case of the Campo Verde-Honorita Tournavista Corridor .” *Agronomy*, 10(10), 1576.
- Rubin, B. E. R., Gibbons, S. M., Kennedy, S., Hampton-Marcell, J., Owens, S., & Gilbert, J. A. (2013). Investigating the Impact of Storage Conditions on Microbial Community Composition in Soil Samples. *PLoS ONE*, 8(7), e70460.
- Salam, L. B., Obayori, O. S., Ilori, M. O., & Amund, O. O. (2020). Effects of cadmium perturbation on the microbial community structure and heavy metal resistome of a tropical agricultural soil. *Bioresources and Bioprocessing*, 7(1), 1–19.
- Salmonová, H., & Bunešová, V. (2017). Methods of Studying Diversity of Bacterial Communities: A Review. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 48(3), 154–165.
- Sanchez, E. R. C., & Barbosa Domínguez, N. H. (2019). *Determinación del valor comercial de cultivos de cacao. Caso de estudio Vereda Ceibal en el municipio de Yacopí, y vereda Peñalosa en el municipio de Caparrapí en el Departamento de Cundinamarca* [Trabajo de grado]. Universidad Distrital Francisco José de Caldas.
- Sánchez, M. Á., León, D. G., Arce, S. M., López, T. D., & Rodríguez, P. M. (2017). *Manual Técnico del Cultivo de Cacao Prácticas Latinoamericanas*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). <http://www.iica.int>.
- Sánchez, V., Zambrano, J., & Iglesias, C. (2019). *La cadena de valor del cacao en América Latina y el Caribe*. Quito, Ecuador: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina. <https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5382>.
- Santoyo, G., Hernández-Pacheco, C., Hernández-Salmerón, J., and Hernández-León, R. (2017). The role of abiotic factors modulating the plant-microbe-soil interactions: toward sustainable agriculture – a review. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 15(1), 13.
- Schoonover, J. E., & Crim, J. F. (2015). An Introduction to Soil Concepts and the Role of Soils in Watershed Management. *Journal of Contemporary Water Research & Education*, 154(1), 21–47.
- Seshadri, B., Bolan, N. S., & Naidu, R. (2015). Rhizosphere-induced heavy metal (loid) transformation in relation to bioavailability and remediation. *Journal of soil science and plant nutrition*, 15(2), 524-548.
- Shahid, M., Dumat, C., Khalid, S., Niazi, N. K., & Antunes, P. M. C. (2016). Cadmium bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 241* (pp. 73–173). Springer,

Cham.

- Shentu, J. L., He, Z. L., Yang, X. E., & Li, T. Q. (2008). Microbial activity and community diversity in a variable charge soil as affected by cadmium exposure levels and time. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 9(3), 250–260.
- Silva, E. B., Alves, I. S., Alleoni, L. R. F., Graziotti, P. H., Farnezi, M. M. M., Santos, L. L., Prochnow, J. T. & Fontan, I. C. I. (2020). Availability and toxic level of cadmium, lead and nickel in contaminated soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 51(10), 1341-1356.
- Singh, K., Senadheera, D. B., & Cvitkovitch, D. G. (2014). An intimate link: two-component signal transduction systems and metal transport systems in bacteria. *Future microbiology*, 9(11), 1283-1293.
- Sochor, J., Zitka, O., Hynek, D., Jilkova, E., Krejcová, L., Trnkova, L., Adam, V., Hubalek, J., Kynicky, J., Vrba, R., & Kizek, R. (2011). Bio-sensing of cadmium(II) ions using *Staphylococcus aureus*. *Sensors*, 11(11), 10638–10663.
- Soil Survey Staff. (2014). Keys to soil taxonomy. United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service, USA. In Soil Conservation Service.
- Soler, F. (2017). *Diagnóstico de los niveles de cadmio en el suelo y su distribución en hojas y frutos de cacao Cultivado en Nilo y Yacopí, Cundinamarca* [Trabajo de Grado]. Universidad Nacional de Colombia.
- 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.
- Sowmya, M., & Mohamed Hatha, A. A. (2017). Cadmium and Lead Tolerance Mechanisms in Bacteria and the Role of Halotolerant and Moderately Halophilic Bacteria in Their Remediation. In *Handbook of Metal-Microbe Interactions and Bioremediation* (pp. 1–18). CRC Press.
- Srinivasarao, C., Rama Gayatri, S., Venkateswarlu, B., Jakkula, V. S., Wani, S. P., Kundu, S., Sahrawat, K. L., Rajasekhara, B. K., Marimuthu, S. & Gopala Krishna, G. (2014). Heavy metals concentration in soils under rainfed agro-ecosystems and their relationship with soil properties and management practices. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11(7), 1959-1972.
- Stein, L. Y., & Klotz, M. G. (2016). The nitrogen cycle. *Current Biology*, 26(3), R94–R98.
- Sukarjo, Zulaehah, I., & Purbalisa, W. (2019, July). The critical limit of cadmium in three types of soil texture with shallot as an indicator plant. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2120, No. 1, p. 040012). AIP Publishing LLC.
- Sun, H., Shao, C., Jin, Q., Li, M., Zhang, Z., Liang, H., Lei, H., Qian, J. & Zhang, Y. (2022). Effects of cadmium contamination on bacterial and fungal communities in Panax ginseng-growing soil. *BMC microbiology*, 22(1), 1-14.
- Tale, K. S., & Ingole, S. (2015). A review on role of physico-chemical properties in soil

- quality. *Chemical Science Review and Letters*, 4(13), 57-66.
- Theodoulou, F. L., and Kerr, I. D. (2015). ABC transporter research: going strong 40 years on. *Biochemical Society Transactions*, 43(5), 1033-1040.
- Thukral, A. K. (2017). A review on measurement of Alpha diversity in biology. *Agricultural Research Journal*, 54(1), 1–10.
- Tipayno, S. C., Truu, J., Samaddar, S., Truu, M., Preem, J. K., Oopkaup, K., Espenberg, M., Chatterjee, P., Kang, Y., Kim, K. & Sa, T. (2018). The bacterial community structure and functional profile in the heavy metal contaminated paddy soils, surrounding a nonferrous smelter in South Korea. *Ecology and Evolution*, 8(12), 6157-6168.
- Tiwari, S., & Lata, C. (2018). Heavy metal stress, signaling, and tolerance due to plant-associated microbes: an overview. *Frontiers in plant science*, 9, 452.
- Uhlik, O., Strejcek, M., Hroudova, M., Demnerova, K., & Macek, T. (2013). Identification and characterization of bacteria with bioremediation potential: from cultivation to metagenomics. *Chemické listy*, 107(8), 614-622.
- Ur Rahman, S., Xuebin, Q., Riaz, L., Yasin, G., Noor Shah, A., Shahzad, U., Jahan, M. S., Dita, A., Bashir, M. A., Rehim, A. & Du, Z. (2021). The interactive effect of pH variation and cadmium stress on wheat (*Triticum aestivum* L.) growth, physiological and biochemical parameters. *Plos one*, 16(7), e0253798.
- USDA. (2014). *Soil Physical and Chemical Properties*. (21 de enero de 2022). https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/nj/home/?cid=nrcs141p2_018993#:~:text=Some%20plant%20nutrients%20and%20metals,cations%20in%20the%20soil%20environment.
- Van Vliet, J. A., & Giller, K. E. (2017). Mineral nutrition of cocoa: a review. *Advances in agronomy*, 141, 185-270.
- Villa, J. E. L., Peixoto, R. R. A., & Cadore, S. (2014). Cadmium and Lead in Chocolates Commercialized in Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(34), 8759–8763.
- Wang, X., Lu, X., Yi, X., Li, Z., Zhou, Y., Duan, G., & Lei, M. (2021). Changes in soil available cadmium and bacterial communities after fallowing depend on contamination levels. *Journal of Soils and Sediments*, 21(3), 1408-1419.
- Wei, H., Peng, C., Yang, B., Song, H., Li, Q., Jiang, L., Wei, G., Wang, K., Wang, H., Liu, S., Liu, X., Chen, D., Li, Y., & Wang, M. (2018). Contrasting Soil Bacterial Community, Diversity, and Function in Two Forests in China. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1693.
- Willis, C., Desai, D., & LaRoche, J. (2019). Influence of 16S rRNA variable region on perceived diversity of marine microbial communities of the Northern North Atlantic. *FEMS microbiology letters*, 366(13), fnz152.
- Wu, Z., Zhao, X., Sun, X., Tan, Q., Tang, Y., Nie, Z., & Hu, C. (2015). Xylem transport and gene expression play decisive roles in cadmium accumulation in shoots of two oilseed

- rape cultivars (*Brassica napus*). *Chemosphere*, 119, 1217–1223.
- Xia, P., Lian, S., Wu, Y., Yan, L., Quan, G., & Zhu, G. (2021). Zinc is an important inter-kingdom signal between the host and microbe. *Veterinary Research*, 52(1), 1-14.
- Xie, Y., Bu, H., Feng, Q., Wassie, M., Ameer, M., Jiang, Y., Bi, Y., Hu, L. & Chen, L. (2021). Identification of Cd-resistant microorganisms from heavy metal-contaminated soil and its potential in promoting the growth and Cd accumulation of bermudagrass. *Environmental Research*, 200, 111730.
- Yang, G. L., Zheng, M. M., Tan, A. J., Liu, Y. T., Feng, D., & Lv, S. M. (2021). Research on the mechanisms of plant enrichment and detoxification of cadmium. *Biology*, 10(6), 544.
- Yakoubi, L., Benmalek, Y., Benayad, T., & Fardeau, M. L. (2018). Characterization of cadmium-resistant bacteria isolated from polluted soils in Algeria, and evaluation of cadmium removal, using living free and immobilized cells. *Revue d'Ecologie, Terre et Vie*, 73(3), 255-268.
- Yu, X., Zhao, J., Liu, X., Sun, L., Tian, J., & Wu, N. (2021). Cadmium pollution impact on the bacterial community structure of arable soil and the isolation of the cadmium resistant bacteria. *Frontiers in microbiology*, 12.
- Zeng, X., Tang, J., Liu, X., & Jiang, P. (2012). Response of *P. aeruginosa* E1 gene expression to cadmium stress. *Current Microbiology*, 65(6), 799–804.
- Zug, K. L. M., Huamaní Yupanqui, H. A., Meyberg, F., Cierjacks, J. S., & Cierjacks, A. (2019). Cadmium Accumulation in Peruvian Cacao (*Theobroma cacao* L.) and Opportunities for Mitigation. *Water, Air, and Soil Pollution*, 230(3), 72.
- Zulfiqar, U., Ayub, A., Hussain, S., Waraich, E. A., El-Esawi, M. A., Ishfaq, M., Ahmad, M., Ali, N. & Maqsood, M. F. (2021). Cadmium toxicity in plants: Recent progress on morpho-physiological effects and remediation strategies. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 1-58.