

**MICROORGANISMOS CULTIVABLES ASOCIADOS A CADMIO (Cd) PRESENTES EN
SUELOS CACAOTEROS DE LOS MUNICIPIOS DE YACOPÍ Y NILO, COMO ESTRATEGIA
DE BIORREMEDIACIÓN**

J, Cáceres^{1,2}; E, Torres^{1,3},

¹Laboratorio de Agrobiotecnología. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia; ²Estudiante de Ingeniería Agronómica jacaceresz@unal.edu.co

³Profesora asociada, PhD. etorresr@unal.edu.co

RESUMEN

En Colombia, el cultivo de Cacao (*Theobroma cacao* L.) está bien posicionado en el mercado internacional por su sabor y aroma y se ha reportado un incremento del 45% en exportaciones a países de la Unión Europea. No obstante, esta planta puede absorber y traslocar cadmio (Cd) al fruto, lo que podría restringir su exportación. El Cd es un metal pesado, tóxico y móvil en el suelo, cuyas fuentes pueden ser geogénicas, producto de erupciones volcánicas, meteorización de la roca madre y quema de vegetación, o antropogénicas, por fertilización, desechos industriales y minería. En busca de alternativas para disminuir los niveles de Cd en grano, se caracterizó la comunidad microbiana cultivable asociada a suelos cacaoteros con diferentes niveles de Cd (bajo<1.2; medio:1.2-4.0; alto>4.0 mg/kg), en los municipios de Nilo y Yacopí (Cundinamarca), en cinco localidades. Para ello, se determinó la abundancia y diversidad de los morfotipos aislados en medio sólido con 6 mg/kg de Cd, aumentando la dosis a 12-18-24 mg/kg para conocer el nivel de tolerancia a Cd, en condiciones de laboratorio. Adicionalmente, se caracterizaron macro y microscópicamente los morfotipos puros obtenidos y también se identificaron a nivel molecular usando marcadores 16S e ITS1-4 del rADN para bacterias y hongos, respectivamente. Los resultados obtenidos se analizaron con base en las condiciones de suelo y manejo agronómico. Se encontró mayor abundancia de bacterias (logUFC > 5.6) que de hongos (logUFC > 5.2) en todos los suelos estudiados, sin embargo el suelo con el nivel más alto de Cd presentó menor abundancia y mayor riqueza de hongos y bacterias, con respecto a las demás localidades. El 82% (n=28) de las bacterias aisladas corresponden al filo Proteobacterias con géneros representativos y con potencial agrobiotecnológico como *Pseudomonas* spp. *Halomonas* sp. y *Herbaspirillum* sp. y el 93% (n=55) de los morfotipos fúngicos pertenece a la división Ascomycota con *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp, entre otros. La mayor tolerancia a Cd de los morfotipos bacterianos fue de 18 mg/kg de Cd, tolerada por 54.2% (n=19) de los morfotipos aislados, mientras que el 93% (n=55) de los hongos toleró 24 mg/kg de Cd. Los resultados obtenidos en este estudio brindan conocimiento de la diversidad microbiana asociada al cultivo de cacao con potencial para ser utilizada en programas de biorremediación, con tecnologías regionales que permitan el uso de los microorganismos in situ o utilizando los microorganismos para elaborar productos biotecnológicos.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de Cacao es considerado un cultivo tradicional de exportación, categorizado como bebida tropical junto con el té y el café¹. En Colombia se reporta un volumen de 56.785 toneladas de grano seco de cacao para el 2016², volumen poco competitivo en el mercado internacional. Sin embargo, Colombia tiene una gran potencialidad para desarrollar mercados especializados en donde se encuentran los cacaos finos y de aroma^{3,4}.

No obstante, como parte de la determinación de la calidad del cacao, se ha encontrado la presencia de cadmio (Cd) en materiales provenientes de Suramérica^{5, 6, 7}. En Colombia se ha reportado la presencia de Cd en muestras de cacao con valores máximos de 5.0 mg/kg⁸; al suroccidente de Ecuador se han encontraron valores máximos de 3 mg/kg de Cd en la cáscara y de 0.5 mg/kg de Cd en la almendra⁹. Esto debido a que la planta de cacao es considerada una planta fitoextractora que tiene la capacidad de absorber, translocar y acumular Cd¹⁰.

Debido a esto, la Unión Europea reglamentó que la ingesta semanal tolerable (IST) de Cd es de 2.5 µg/kg por peso corporal y con relación al cacao, la FAO y la OMS restringirá la comercialización de los productos derivados del cacao con trazas de Cd^{6,10}. Por lo tanto, es necesario generar estrategias de manejo del cultivo que permitan disminuir la presencia de Cd en el fruto. En este sentido, el uso de microorganismos que pueden bioacumular o bioadsorber este elemento, pueden contribuir a la disminución de las concentraciones de Cd en los órganos vegetales¹¹. Además se ha encontrado una relación positiva entre la comunidad microbiana y la disminución de la disponibilidad y solubilidad de Cd¹².

El objetivo de esta investigación fue caracterizar la comunidad microbiana cultivable asociada a suelos cacaoteros con diferentes niveles de Cd, en los municipios de Yacopí y Nilo (Cundinamarca). Para ello, se aislaron los microorganismos cultivables en medio de cultivo con 6 mg/kg de Cd y determinó la abundancia y riqueza de los morfotipos puros obtenidos. Además, se determinó la concentración mínima inhibitoria a la cual estos morfotipos pueden ser tolerantes a Cd. Se realizó una caracterización macro y microscópica de los morfotipos encontrados y se comprobó su identificación a nivel molecular usando el marcador 16S e ITS1-4 del rADN para bacterias y hongos, respectivamente. Finalmente, los resultados obtenidos se analizaron con base en los análisis físico-químicos del suelo y con el tipo fertilización utilizado en las zonas estudiadas.

Esta investigación hace parte del proyecto de Mejoramiento de la productividad de cacao en las provincias de Rionegro y Alto Magdalena, el cual hace parte del derivado No. 2 del Convenio Marco 395 de 2012, en donde participan las siguientes entidades Universidad Nacional de Colombia, Alcaldía Mayor de Cundinamarca, Gobernación de Cundinamarca, CORPOICA y FEDECACAO.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se localizó en los municipios de Nilo y Yacopí (Cundinamarca-Colombia). Se seleccionaron dos fincas en Nilo y tres en Yacopí, por la concentración de Cd encontrada en el suelo y el tipo de fertilización empleada (convencional u orgánica), para un total de 5 fincas (Tabla 1).

Tabla 1. Niveles de Cd encontrados en las fincas seleccionadas, clasificados en niveles de acuerdo a la presencia de Cd total (mg/kg): bajo <1.20; medio: entre 1.20 a 4.0; alto >4.0 **Fuente:** Soler, 2017.

	Nivel de Cd	Cd Total (mg/kg)	Cd disponible (mg/kg)
NO	Bajo	0.67	0.07
NC	Bajo	1.20	0.58
Y1	Bajo	0.7	<0.01
Y2	Medio	3.88	0.30
Y3	Alto	> 4.0	>1

El municipio de Nilo se encuentra ubicado al sur-occidente del departamento de Cundinamarca (Figura 1). Se reporta una temperatura promedio de 27°C, una precipitación de 1004.14 mm/año (Figura 2) y de acuerdo al sistema de clasificación de Holdridge pertenece a la zona de vida “Bosque seco tropical” (bs-T)¹³. En este municipio se escogieron dos fincas, [NO] (4°19'20.4"N-74°33'14.3"W), con manejo de fertilización orgánica y [NC] (4°21'7.7"N-74°32'49.6"W), con fertilización convencional.

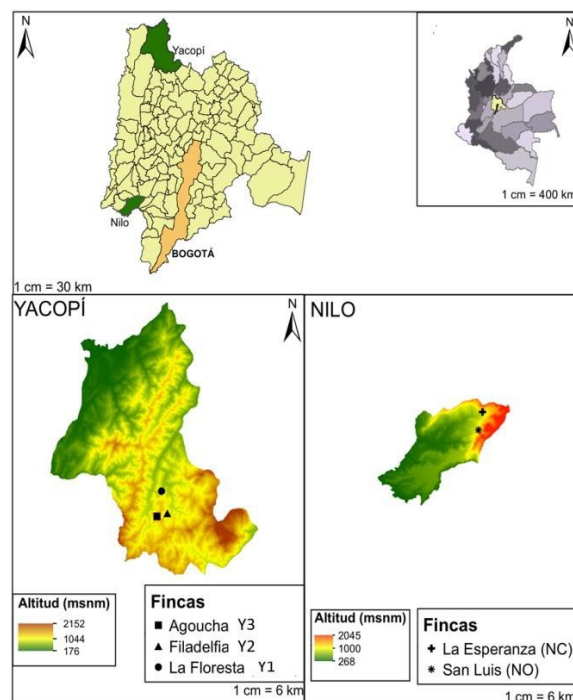


Figura 1. Ubicación de la zona de estudio en el departamento de Cundinamarca.

El municipio de Yacopí se sitúa a 177 kilómetros al noroccidente de Cundinamarca (Figura 1), con un clima promedio de 17.32°C, precipitación promedio de 2408.39 mm/año, pertenece a la zona de vida bosque muy húmedo premontano (bmh-PM) según el sistema de clasificación de Holdridge^{13, 14}. Las tres fincas escogidas en Yacopí presentan manejo de fertilización convencional y corresponden a [Y1] (5°29'2.70"N - 74°20'0.75"W), [Y2] (5°29'16.5"N - 74°20'4.2"W) y [Y3] (5°29'2.8"N - 74°21'7.74"W).

Muestreo de suelos y aislamiento de microorganismos

Las muestras fueron tomadas de suelos rizosféricos (30 cm de profundidad), se seleccionaron 10 árboles por finca, en donde cada árbol fue una submuestra correspondiente a los cuatro puntos cardinales de la planta. Todas las muestras fueron almacenadas a baja temperatura en neveras de icopor y llevadas al laboratorio de Agrobiotecnología y de Suelos de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia (UNAL), para realizar los análisis microbiológicos y fisicoquímicos de suelos, respectivamente.

Para el aislamiento de microorganismos se realizaron diluciones seriadas de suelo¹⁵, se tomaron 50 g de suelo tamizado y se suspendió en un volumen de 450 ml de solución salina al 0.85% y se agitó en vórtex; posteriormente se tomó 1 ml de esta solución y se transfirió a un tubo de ensayo con 9 ml de solución salina (10^{-1}) el procedimiento fue repetido hasta la dilución 10^{-7} , posteriormente se sembraron 100 μ l de las diluciones 10^{-3} , 10^{-5} y 10^{-7} para bacterias, y 10^{-3} y 10^{-5} para hongos en una caja de Petri con medio de cultivo (Tris HCl 50 mM, 6,06 g; NaCl 80 mM, 4,68 g; KCl 20 mM, 1,49 g; NH₄Cl 20 mM, 1,07 g; Na₂SO₄ 3 mM, 0,43 g; MgCl₂.6H₂O 1 mM, 0,20 g; CaCl₂.2H₂O 0,2 mM, 30 mg; K₂HPO₄, 0,2g; Agar 20 g; Glucosa 1 g; pH 7 bacterias; pH 5 hongos)¹⁸, se utilizó una concentración de 6 mg/kg de Cd, de una solución stock estéril de 600 mg/kg de Cd y se adicionó 10 ml/ al medio autoclavado.

Análisis de Abundancia, riqueza y diversidad de morfitipos aislados

Los microorganismos fueron incubados en condiciones de oscuridad, las bacterias a 37°C durante 2-4 días y los hongos a temperatura ambiente durante 10 días, posteriormente se realizó el conteo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) y se procedió a realizar aislamientos de los morfotipos diferentes en el mismo medio de aislamiento. Para la caracterización macro y microscópica de bacterias, se registró el tamaño con un pie de rey, color, forma, borde, superficie, elevación, luz reflejada y consistencia; la caracterización microscópica se realizó mediante la tinción de Gram siguiendo el método convencional. Para hongos, la caracterización macroscópica correspondió al color del micelio (pigmentación); aspecto y la generación de pigmentos difusibles en el medio; la caracterización microscópica se realizó con microcultivos. El tipo de hifas, la forma de las estructuras sexuales y asexuales, se describieron para realizar una aproximación a género a través de claves taxonómicas. Para evaluar la diversidad alfa al interior de cada una de las localidades se utilizaron los índices de Shannon-Wiener, Margalef y Simpson y para realizar la comparación entre localidades con análisis de diversidad beta se utilizó el índice de Jaccard¹⁶.

Identificación molecular de los morfotipos aislados

La identificación molecular de los morfotipos obtenidos se realizó mediante la extracción de ADN y la amplificación de marcadores moleculares 16S e ITS1-4 del gen rDNA para bacterias y hongos, respectivamente. Para bacterias se realizó extracción de ADN¹⁷ y posteriormente se realizó la amplificación del gen 16S ADNr utilizando los primers 27F y 1492R; para hongos se extrajo ADN y se amplificó la región ITS1¹⁵. El producto de PCR fue llevado al Servicio de Secuenciación y Análisis Molecular (SSiGMol) de la UNAL sede Bogotá. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias en NCBI usando BLAST.

Para determinar el nivel de tolerancia a Cd, los morfotipos aislados se cultivaron en medio sólido¹⁸ aumentando gradualmente la concentración de Cd (12, 18, 24 mg/kg) en el medio. Para el análisis de datos, se realizó análisis de varianza (ANOVA) con $P < 0.05$ y pruebas de comparación múltiple (Tukey), usando el software SAS (Statistical Analysis System), con base en un diseño completamente al azar; las localidades y concentraciones de Cd fueron las condiciones a evaluar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Muestreo de suelos y aislamiento de microorganismos

El LogUFC·g⁻¹ de suelo seco es una medida indirecta de la abundancia de microorganismos presentes en el suelo. En este estudio se encontró una abundancia mayor de bacterias (logUFC > 5.6) que de hongos (logUFC > 5.2) en todos los suelos estudiados (Figura 4). NO y NC presentaron el mayor número de

morfotipos de bacterias y hongos respectivamente, en contraste, la finca con alto contenido de Cd (Y3) presentó una menor abundancia de microorganismos con relación a las fincas evaluadas. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 2). En general la abundancia de microorganismos que crecieron en un medio con 6 mg/kg CdCl₂ fue inferior al reportado para suelos agrícolas (logUFC10⁸ a 10⁹), considerando valores por debajo de 10⁶ células/gramo de suelo seco, como suelos con bajo contenido microbiano^{19,20}.

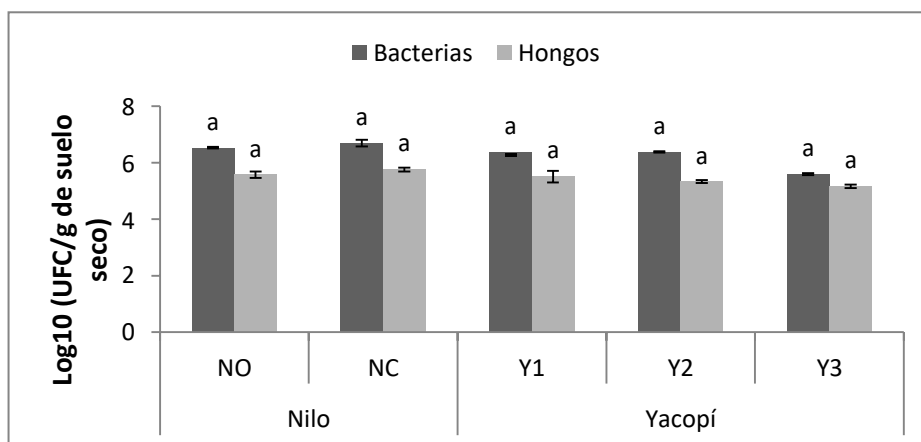


Figura 2. Recuento del logUFC en medio con 6 mg/Kg de Cd, obtenidas a partir de suelos de los municipios de Nilo y Yacopí (Cundinamarca). Las letras sobre las barras representan diferencias significativas entre localidades y las letras al medio de las barras entre organismos de la misma localidad ($p=0,05$) de acuerdo a la prueba de comparación múltiple, Tukey.

Análisis de abundancia, riqueza y diversidad de morfotipos

El bajo número de microorganismos encontrados en las muestras se atribuye a la presencia de Cd en el medio de crecimiento, debido a que la interacción de metales y minerales con microorganismos puede afectar su crecimiento, actividad y sobrevivencia²¹, sin embargo no se encontró correlación entre la abundancia y el contenido de Cd presente en los suelos (Figura 3).

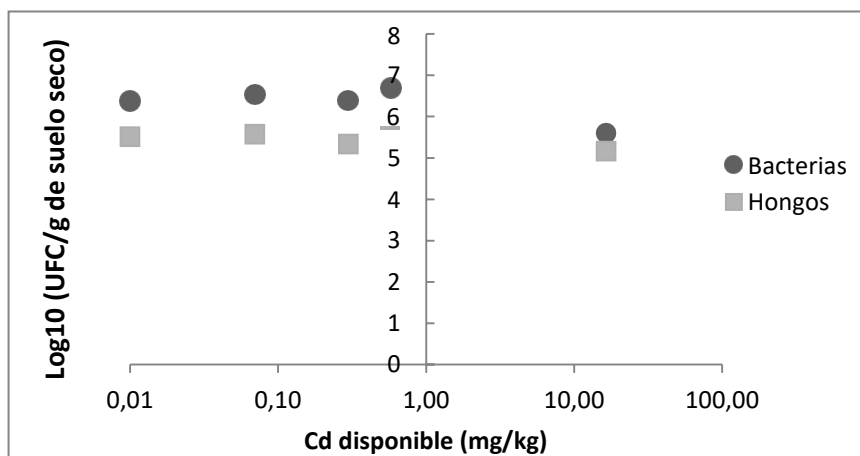


Figura 3. Relación entre el logUFC en medio con 6 mg/Kg de Cd y el contenido de Cd disponible en los suelos muestreados. Los valores se expresan en escala logarítmica (base 10) en el eje x para permitir su representación en el gráfico de dispersión.

La riqueza, se determinó al tercer aislamiento en medio sólido con 6 mg/kg de Cd para cada uno de los puntos de muestreo realizados. Los resultados obtenidos muestran que la finca con mayor nivel de Cd (Y3) presentó a su vez el mayor número de morfotipos iniciales, tanto para bacterias como para hongos (Tabla 2).

Las muestras de suelo (NO, NC, Y1, Y2) fueron colectadas durante el primer pico de lluvias del año (mayo) según el histórico 1975-2011 y en Y3 el muestreo se realizó comenzando la segunda época húmeda del año (septiembre); el promedio de precipitación en el mes de mayo es de 163.7 mm/día en Nilo y 321.99 mm/día en Yacopí y para el mes de septiembre la precipitación en Yacopí fue de 242.14 mm/día. A pesar de las diferencias climáticas encontradas en estos dos municipios no se encontró

correlación entre la humedad relativa, temperatura y precipitación con respecto a la abundancia de microorganismos presentados en los aislamientos.

Tabla 2. Riqueza de morfotipos aislados en medio sólido suplementado con 6 mg/kg de Cd, encontrados en cada punto de muestreo.

Punto de muestreo	Microorganismos	No. Morfotipos iniciales	No. Morfotipos finales*
NO	Bacterias	11	9
	Hongos	21	22
NC	Bacterias	34	7
	Hongos	21	12
Y1	Bacterias	14	10
	Hongos	17	8
Y2	Bacterias	24	7
	Hongos	22	14
Y3	Bacterias	92	17
	Hongos	95	24

* Morfotipos viables después del tercer repique en medio Mergeay con 6 mg/kg.

En relación a características del suelo como el pH, el contenido de MO, el contenido de Zn y la textura, no se encontró correlación con la abundancia de crecimiento microbiano, a pesar de que son factores que afectan las poblaciones de microorganismos presentes en el suelo debido a que la fase edáfica es el nicho ecológico de esta comunidad biótica²².

La diversidad, riqueza y equidad de hongos fue mayor con respecto a las bacterias (Tabla 3), esto puede atribuirse a las estrategias de resistencia que se han reportado previamente para hongos, tales como la compartimentalización intracelular, mecanismos de flujo, adsorción extracelular, quelatación, entre otros²¹.

De acuerdo con los índices de diversidad Margalef y Simpson, la localidad con mayor riqueza y diversidad es Y3 siendo además la localidad más uniforme de acuerdo a Shannon (Tabla 3), a su vez la localidad Y3 presentó la mayor riqueza con un total de 23 especies diferentes para hongos y 17 para bacterias, de las cuales 18 hongos y 8 bacterias son únicos para esta localidad.

Tabla 3. Análisis de diversidad alfa de los morfotipos tolerantes a Cd aislados en medio Mergeay con 6 mg/kg de Cd. Índice de Margalef (S); Índice de Simpson (D); Índice de Shannon-Wiener (H).

		S	D	H
BACTERIAS	NO	1,820	0,111	1,677
	NC	2,056	0,143	1,475
	Y1	2,606	0,089	1,834
	Y2	2,056	0,143	1,475
	Y3	2,824	0,125	1,952
HONGOS	NO	4,206	0,069	2,426
	NC	2,817	0,091	1,936
	Y1	2,885	0,036	1,906
	Y2	3,410	0,066	2,168
	Y3	5,664	0,029	2,831

La mayor similitud encontrada entre localidades fue Y1-Y2 (Tabla 4), la localidad Y3 no tuvo similitud con ninguna localidad para bacterias debido a que ninguno de los morfotipos encontrados allí se presentó en otra localidad. En cuanto a los hongos, la mayor similitud se presentó entre Y1- Y2 (Tabla 4). En el caso de los morfotipos fúngicos se encontró una similitud generalizada debido a que tres de los morfotipos aislados (*Pseudollascheria* sp., *Penicillium* sp. y *Trichoderma* sp.) fueron encontrados en todas las localidades.

Tabla 4. Matriz de diversidad beta entre las localidades trabajadas, de los morfotipos tolerantes a Cd aislados en medio Mergeay con 6 mg/kg de Cd.

	NO	NC	Y1	Y2	Y3	SIMILITUD GENERAL	
NO		0,059	0,240	0,158	0,000		Bacterias
NC	0,128		0,150	0,176	0,000		
Y1	0,091	0,130		0,292	0,000	0	Hongos
Y2	0,077	0,103	0,185		0,000		
Y3	0,077	0,130	0,000	0,073			
SIMILITUD GENERAL		0,036					

La relación de similitud Y1-Y2 puede estar asociada a las condiciones climáticas ya que las características edáficas difieren entre estas localidades, sin embargo la época en la cual fueron colectadas correspondió en ambas a periodos de alta pluviosidad, además al ser localidades cercanas geográficamente los periodos de lluvia y cambios de temperatura pueden generar alta similitud entre ellas. La diversidad aparentemente está relacionada con el nivel de Cd de las localidades, en donde Y3 presenta los mejores valores de diversidad y riqueza y a su vez es la localidad con los mayores valores de Cd total y disponible, sin embargo no se encontró una correlación para el resto de localidades.

Identificación molecular de los morfotipos aislados

El 82% (n=28) de las bacterias corresponde al filo Proteobacterias, el 12% a firmicutes (n=4) y el 3% a actinobacterias (n=1) con el género *Rhodococcus* sp.; en general la diversidad de bacterias fue inferior con respecto a la diversidad de hongos. Se encontraron 8 familias en los aislamientos realizados las cuales son, Pseudomonadaceae (Pseudomonadales), Enterobacteriaceae (Enterobacteriales), Burkholderiaceae (Burkholderiales), Halomonadaceae (Oceanospirillales), Bacillaceae (Bacillales), Nocardiaceae (Actinomycetales), Staphylococcaceae (Bacillales), Oxalobacteraceae (Burkholderiales) (Figura 4).

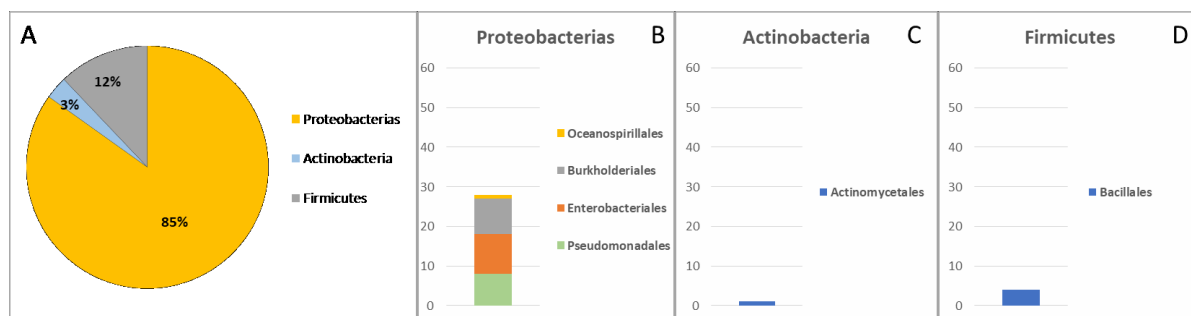


Figura 4. Distribución de los morfotipos bacterianos aislados en filos y órdenes taxonómicos.

El 90% (n=55) de los morfotipos fúngicos corresponde a la división Ascomycota (Figura 5), los órdenes Hypocreales y Eurotiales fueron los que presentaron mayor frecuencia, ya que es en los cuales se agrupan la mayoría de morfotipos aislados en esta investigación. La división ascomycota es el grupo más diverso de hongos, en donde se encuentran especies saprofitas, parásitas de plantas, animales y otros hongos, así como aquellos que forman relaciones simbióticas con líquenes e incluso micorrizas²³.

En total se encontraron 21 familias entre los morfotipos aislados, en donde las familias más representativas son Hypocreae (Hypocreales), Nectriaceae (Hypocreales), Chaetomiaceae (Sordariales) y Trichocomaceae (Eurotiales), se presentaron además dos levaduras *Rhodotorula* sp. y *Meyerozyma guilliermondii*, las cuales presentaron alto potencial debido a la tolerancia a Cd y actividad en otros ciclos biogeoquímicos.

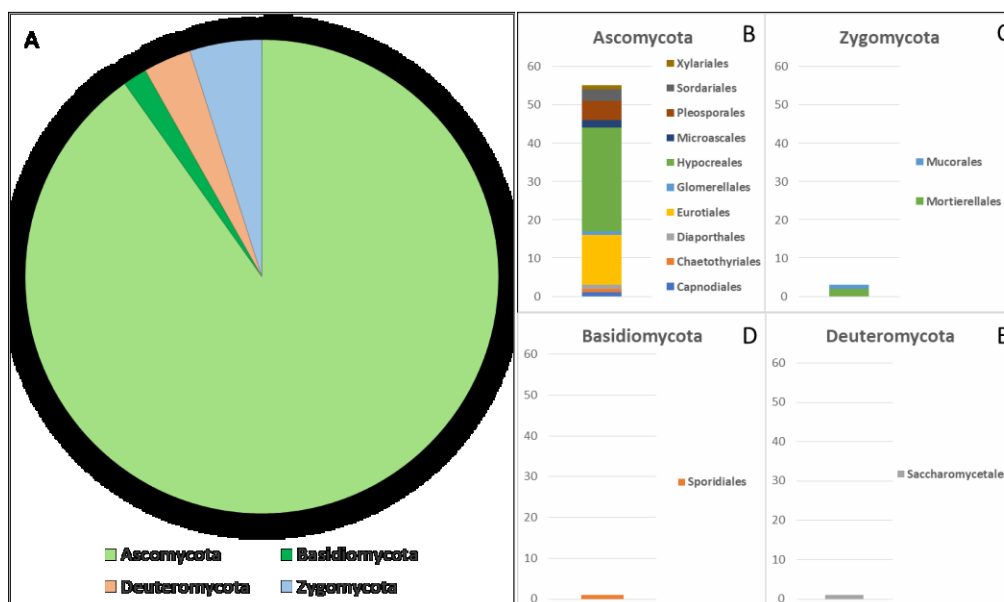


Figura 5. Distribución de los morfotipos fúngicos aislados en divisiones y órdenes taxonómicos.

De los 35 morfotipos bacterianos, tan solo 10 morfotipos corresponden a géneros diferentes, siendo los más frecuentes *Burkholderia* sp., *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp. y *Serratia* sp. Géneros como *Herbaspirillum* sp., *Halomonas* sp. y otros pueden ser potenciales en procesos de biorremediación, por lo cual sería pertinente ahondar más en las vías a través de las cuales se genera la tolerancia a este metal pesado, para lograr establecer los procesos indicados con las cepas seleccionadas.

De las cinco localidades se aislaron un total de 64 morfotipos fúngicos, que corresponden a 28 géneros, ya que géneros como *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. y *Trichoderma* sp. fueron frecuentes en todas las localidades y se encuentran representados en varios morfotipos, tres de los morfotipos fúngicos no fueron identificados debido a dificultades en las extracción y la amplificación de ADN.

Otros géneros fúngicos como *Mortierella* sp., *Fusarium* sp., *Rhodotorula* sp., *Pochonia* sp., *Acremonium* sp. y *Metarrhizium* sp. podrían ser utilizados regionalmente, en las zonas de las cuales fueron aislados pues tienen reportes previos de tolerancia y actividad de bioacumulación y bioadsorción de metales pesados. Las especies más frecuentes presentan también alto potencial para ser utilizadas en estrategias de manejo; especies como *Trichoderma harzianum* han sido ampliamente utilizadas en control biológico por su resistencia natural a agentes químicos, también se ha encontrado crecimiento en sustratos con contenido de Cd, elemento que afecta la producción de biomasa en función de la concentración²⁴.

CONCLUSIONES

La presencia de Cd en suelos asociados al cultivo de cacao afecta la diversidad de la comunidad microbiana cultivable, lo cual se logró observar a través del análisis de diversidad alfa, encontrando mayores valores para la localidad Y3.

Los hongos presentaron mayor tolerancia a Cd (24mg/kg) en comparación con las bacterias indicando una mayor adaptación evolutiva a esta condición de estrés abiótico. Se encontraron microorganismos tolerantes a Cd con potencialidad para diseñar estrategias de manejo del cultivo que disminuyan la absorción de Cd por el sistema radical de la planta de cacao.

BIBLIOGRAFÍA

1. FAO. 2002. Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030. Informe Resumido. En: <http://ftp.fao.org/docrep/fao/004/y3557S/y3557s00.pdf>. Consultado: Julio de 2016.
2. FEDECACAO. 2016. Estadística y Recaudo. En: <http://www.fedecacao.com.co/portal/index.php/es/2015-02-12-17-20-59/nacionales>. Consultado en: Octubre de 2017.
3. ICCO. 2010. *The World Cocoa Economy: Past and Present*. International Cocoa Organization
4. Rojas, F. Sacristan, E. 2013. Guía ambiental para el cultivo del cacao. Segunda edición. Federación Nacional de Cacaoteros. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

5. Moinicou, S. Szpunar, J. Andrey, D. Blake, C. Lobinski, R. 2003. Concentrations and bioavailability of cadmium and lead cocoa powder and related products. *Food Additives and Contaminants*. 20(4):343-352.
6. Mite, F. Carrillo, M. Durango, W. 2010. Avances del monitoreo de presencia de cadmio en almendras de cacao, suelos y aguas en Ecuador. XII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo.
7. IPNI. 2015. *Metales Pesados En Cacao , Perspectivas Y Posible Manejo*.
8. González A., Camargo J., Castellanos H. 2010. Determinación y validación de Cd total e intercambiable en algunos suelos cacaoteros del departamento de Santander. Tesis. Universidad Industrial de Santander. 1-172.
9. Chavez, E. He, Z. Stofella, P. Mylavarapu, R. Li, Y. Moyano, B. Baligar, V. 2015. Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *Sci. Tot. Env.* 533: 205-214.
10. Villa, J. Peixoto, R. Cadore, S. 2014. Lead and cadmium found in some chocolate bought in Brazil. *J. Agric. Food Chem.*, 62:8759-8763.
11. Limcharoensuk, T. Sooksawat, N. Sumarnrote, A. Awutpet, T. Kruatrachue, M. Pokethitiyook, P. Auesukaree, C. 2015. Bioaccumulation and biosorption of Cd²⁺ and Zn²⁺ by bacteria isolated from a zinc mine in Thailand.
12. Sharma, R. Archana, G. 2016. Cadmium minimization in food crops by cadmium resistant plant growth promoting rhizobacteria. *Review. Applied Soil Ecology* 107:66-78.
13. IGAC. 2000. Estudio general de suelos y zonificación de tierras del departamento de Cundinamarca. Instituto GeograficoAgustin Codazzi. Cundinamarca.
14. IDEAM. 2016. Histórico de clima Cundinamarca. Instituto de hidrología, meteorología y estudios ambientales.
15. Avellaneda, M. Torres, E. 2014. Caracterización de comunidades microbianas asociadas a prácticas agrícolas y usos del suelo de la vereda El Bosque – Parque Nacional Natural de los Nevados. Universidad Nacional de Colombia. Doctorado en Agroecología Bogotá.
16. Villareal, H. Álvarez, M. Córdoba, S. Escobar, F. Fagua, G. Gast, F. Mendoza, H. Ospina, M. Umaña, A. 2006. Métodos para el análisis de datos: una aplicación para resultados provenientes de caracterizaciones de biodiversidad. En: *Manual de métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá. Colombia.
17. Chen, W. Kuo, T. 1993. A Simple and rapid method for the preparation of gram negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Research*. 21(9).
18. Mergeay, M. 1995. Heavy metal resistances in microbial ecosystems. *Molecular Microbial Ecology Manual* 6.1.7:1-17.
19. Marteinson, V. Klonowski, A. Reynisson, E. Vannier, P. Sigursson, B. Ólafsson, M. 2015. Microbial colonization in diverse surface soil types in Surtsey and diversity analysis of its subsurface microbiota. *Biogeosciences*. 12:1191-1203.
20. Itävaara, M. Salavirta, H. Marjamaa, K. Ruskeeniemi, T. 2016. Chapter one: Geomicrobiology and etagenomics of terrestrial Deep Subsurface Microbiomes. En: Sariaslani, S. 2016. *Advances in Applied Microbiology*. London.
21. Gadd, G. 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*. 156:609-643.
22. Torsvik, V. Ovreas, L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Ecology and industrial microbiology*. 5:240-245.
23. Taylor, T. Krings, M. Taylor, E. 2015. *Fossil fungi*. Elsevier Inc. London.
24. De Freitas, A. Ferreira, G. Barbosa, M. Mendes, P. Alves, C. Campos, G. Elesbao, A. 2011. Role of the Morphology and Polyphosphate in *Trichoderma harzianum* Related to Cadmium Removal. *Molecules*. 16: 2486-2500.